

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Коняева Анастасия Денисовна

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ РАНЕВОЙ ПОВЕРХНОСТИ
СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ
НЕТКАНОЙ ПОЛИМЕРНОЙ ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ В
ЭКСПЕРИМЕНТЕ

1.5.22 – Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
доцент Е.Ю. Варакута

Томск –2023

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	45
2.1. Характеристика экспериментального исследования	45
2.2. Методы исследования	47
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	51
3.1. Макроскопические изменения слизистой оболочки щеки в ходе регенерации раневого дефекта при использовании полимерной пьезоэлектрической мембраны и без нее	51
3.2. Морфологические изменения слизистой оболочки полости рта на месте раневого дефекта в ходе его регенерации при использовании полимерной пьезоэлектрической мембраны и без нее	56
3.2.1. Морфологические изменения эпителиального пласта в зависимости от методики ведения раневого дефекта на разных этапах его заживления	57
3.2.2. Морфологические изменения в собственной пластинке слизистой оболочки полости рта в зависимости от методики ведения раневого дефекта на разных этапах его заживления	73
3.2.3. Восстановление трофического аппарата в области раневого дефекта на разных этапах его заживления при использовании полимерной пьезоэлектрической мембраны и без нее	99
3.2.3.1. Характеристика состояния сосудов микроциркуляторного русла в зависимости от методики ведения раневого дефекта на разных этапах его заживления	99

3.2.3.2. Морфологическая характеристика нервного аппарата в зависимости от методики ведения раневого дефекта на разных этапах его заживления	126
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	133
ВЫВОДЫ	153
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	155
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	156

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Заживление ран слизистой оболочки полости рта является актуальной проблемой. Раневые дефекты данной локализации встречаются у 42% населения, особенно часто у лиц старческого и пожилого возраста, а также у людей с сопутствующими хроническими заболеваниями (Nazir M.A., 2017). Они могут возникать в результате травм слизистой оболочки (Mittal G. et al., 2018), при иссечении обширных участков фиброза (Kumar S. et al., 2021), при тотальной резекции челюстей совместно с окружающими мягкими тканями, уранопластике, ринопластике, удалении кист и новообразований (Butler D.P. et al., 2019).

Несмотря на то, что слизистая оболочка полости рта обладает высоким регенераторным потенциалом (Lee K. et al., 2019, Sculean. et al., 2014) незакрытые раневые дефекты данной локализации подвержены повторному инфицированию и травматизации, вследствие чего происходит рубцевание, образование свищей и гипоплазия нижней трети лица (Singer A.J., 2021).

Согласно принципам пластической хирургии Эшли, защита раны необходима для предотвращения инфицирования, развития контрактуры тканей и рубцевания (Movaniya P.N. et al., 2021). Закрывание раневых дефектов возможно при использовании аутогенных материалов (Singh G., et al., 2018). Однако такие трансплантаты дают плохой постоперационный прогноз в результате формирования негативных эстетических и функциональных нарушений в донорской области (Mittar G. et al., 2018). Замечено, что раны на донорских участках вызывают более сильную послеоперационную боль, чем на первичных реципиентных областях (Solanli N.S., et al., 2012). Кроме того, донорские раны производят гемо-серозный экссудат, который может потребовать повторных перевязок до тех пор, пока не будет достигнута полная эпителизация раны.

Все чаще используются биосинтетические заменители слизистых лоскутов и кожи для преодоления недостатков аутогенных трансплантатов. Они включают

в себя эпидермальные (например, Apligraf®), дермальные (например, Alloderm®, Matriderm®) и композитные (например, Integra®, Biobrane®) мембраны. Однако ни одна из них не обладает всеми свойствами идеального материала для закрытия раневых дефектов слизистой оболочки полости рта (Srivastava A. et al., 2020).

Степень разработанности проблемы. На сегодняшний день достаточно подробно изучены механизмы заживления раневых дефектов кожных покровов, а также слизистой оболочки полости рта (Кузин М.И. и др., 2009, Быков В.Л. и др., 2019). Кроме того, проведены исследования, изучающие влияние покровных мембран на основе силикона, фосфолипидных полимеров, коллагена и других материалов на заживление ран слизистой оболочки полости рта (Рябова Д.А. и др., 2016, Pandey A. et al, 2020, Srivastava A. et al., 2020).

Например, двуслойная пористая мембрана Integra на основе хондроитин-6-сульфата гликозаминогликана и полисилоксана обладает хорошей прочностью на разрыв и контролирует потерю влаги из раневого дефекта. Также она обеспечивает интеграцию юных фибробластов в свой внутренний слой и способствует образованию грануляционной ткани. Однако, этот материал недостаточно изучен, имеется информация только о 6-ти клинических случаях его использования. Также к его недостаткам можно отнести высокую стоимость (Rua Gonzalvez L. et al., 2018).

Покровные мембраны из коллагена создают благоприятные условия для купирования воспалительного процесса (Pandey A. et al, 2020), защищают его от бактериальной инвазии (Singh G. et al., 2018), а также являются хемоаттрактантом для эндотелиальных клеток и фибробластов, что способствует ускорению регенерации (Reddy Y.R. et al., 2012, Shanmugam D. et al., 2019). Однако зачастую они имеют плохие манипуляционные свойства и их проблематично модифицировать лекарственными средствами (Sourav K. et al., 2021).

Известны результаты использования нетканых материалов (scaffolds) на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом (VDF-TeFE) в челюстно-лицевой хирургии для направленной регенерации костной ткани (Godin M. et al., 2003, Tefengraber J. et al., 2002). Они способствуют адгезии, пролиферации и дифференцировки остеобластов и росту нейритов, поддерживают рост шванновских клеток, стимулируют активность щелочной фосфатазы (Li Y. et al, 2019). Тем не менее, отсутствуют сведения о результатах использования подобных мембран для регенерации слизистой оболочки ротовой полости при раневых дефектах.

Цель исследования - изучить морфологические изменения слизистой оболочки полости рта в ходе течения раневого процесса при использовании нетканых пьезоэлектрических полимерных мембран на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом.

Задачи исследования:

1. Изучить морфологические изменения клеточного и волокнистого компонентов собственной пластинки слизистой оболочки полости рта в ходе регенерации в различные фазы раневого процесса при использовании нетканого полимерного покрытия и без него.

2. Изучить морфологические изменения сосудов микроциркуляторного русла слизистой оболочки полости рта в ходе регенерации в различные фазы раневого процесса при использовании нетканого полимерного покрытия и без него.

3. На основании данных иммуногистохимического и ультраструктурного исследований изучить состояние нервного аппарата слизистой оболочки полости рта в ходе регенерации в различные фазы раневого процесса при использовании нетканого полимерного покрытия и без него.

4. Изучить морфологические изменения эпителиального пласта слизистой оболочки полости рта в ходе регенерации в различные фазы раневого процесса при использовании нетканого полимерного покрытия и без него.

5. Сравнить эффективность использования полимерной пьезоэлектрической мембраны, модифицированной медью, и покрытия без модификации.

Научная новизна. В настоящем исследовании впервые были исследованы морфологические изменения слизистой оболочки полости рта в ходе заживления раневого дефекта при использовании полимерной пьезоэлектрической мембраны на основе винилиденфторида с тетрафторэтиленом, созданной в лаборатории гибридных биоматериалов НИ ТПУ.

Был разработан и апробирован способ хирургического лечения раневых дефектов слизистой оболочки полости рта, который способствовал оптимизации процесса его заживления и снижал риск развития послеоперационных осложнений.

Для достижения поставленных задач было проведено комплексное гистологическое, электронно-микроскопическое, иммуногистохимическое и морфометрическое исследование слизистой оболочки полости рта крыс линии Вистар, благодаря чему были подробно исследованы этапы заживления раневого дефекта в зависимости от методики лечения.

Было установлено, что использование полимерной пьезоэлектрической мембраны способствовало закрытию раневого дефекта эпителиальным пластом уже на 3-и сутки исследования и исчезновению в нем патологических изменений в виде акантоза, акантолиза на 12-е сутки. В зоне дефекта наблюдались признаки активного перехода со стадии воспаления на стадию регенерации, что сопровождалось заменой клеток лимфогистиоцитарной инфильтрации на клетки фибробластического ряда уже на 3-и сутки и образованием рыхлой волокнистой соединительной ткани на 7-е сутки исследования. В свою очередь, в группе без покрытия преобладала плотная волокнистая соединительная ткань и сохранялась воспалительная клеточная инфильтрация до 12-ых суток исследования. Было отмечено восстановление показателей гемодинамики на 7-е сутки исследования

в области раневого дефекта и образование периферических нервов на 12-е сутки в группах с раневым покрытием.

В ходе сравнительного анализа было выявлено, что подобные благоприятные изменения были более выражены в группе, где использовалось покрытие, модифицированное медью. В настоящем исследовании впервые были исследованы морфологические изменения в слизистой оболочке полости рта в ходе заживления раневого дефекта при использовании полимерной пьезоэлектрической мембраны на основе VDF-TeFE, созданной в лаборатории гибридных биоматериалов НИ ТПУ.

Был разработан и апробирован способ хирургического лечения раневых дефектов слизистой оболочки полости рта, который способствовал оптимизации процесса их заживления и снижал риск развития послеоперационных осложнений.

Для достижения поставленных задач было проведено комплексное гистологическое, электронно-микроскопическое, иммуногистохимическое и морфометрическое исследование слизистой оболочки полости рта крыс линии Вистар, благодаря чему были подробно исследованы этапы заживления раневого дефекта в зависимости от методики лечения.

Было установлено, что использование полимерной пьезоэлектрической мембраны способствовало более быстрому закрытию раневого дефекта эпителиальным пластом без патологических изменений в виде акантоза, акантолиза. Также наблюдались признаки активного перехода со стадии воспаления на стадию регенерации, что сопровождалось заменой клеток лимфогистиоцитарной инфильтрации на клетки фибробластического ряда в более короткие сроки и образованием рыхлой волокнистой соединительной ткани. В свою очередь, в группе без покрытия преобладала плотная волокнистая соединительная ткань и сохранялась длительная воспалительная клеточная инфильтрация. Также было отмечено ускоренное восстановление показателей

гемодинамики в области раневого дефекта и образование периферических нервов на ранних сроках в группах с раневым покрытием.

В ходе сравнительного анализа было выявлено, что подобные благоприятные изменения были более выражены в группе, где использовалось покрытие, модифицированное медью.

Теоретическая и практическая значимость. Анализ и обобщение результатов исследования морфологических изменений в ходе регенерации раневой поверхности слизистой оболочки полости рта при использовании полимерной матрицы на основе винилиденфторида с тетрафторэтиленом позволили расширить фундаментальные знания об адаптивных, компенсаторно-приспособительных и регенераторных процессах в слизистой оболочке полости рта.

Проведенные качественные и количественные исследования подтвердили необходимость использования покровных материалов для защиты раневой поверхности от травматического воздействия и микробной контаминации.

В ходе сравнительного исследования двух методик ведения раневого дефекта – с покрытием и без него, было установлено, что использование полимерной пьезоэлектрической мембраны способствовало более быстрому заживлению раны без формирования грубых рубцовых изменений, что делает методику ведения раневого дефекта под повязкой более предпочтительной для снижения риска возникновения постоперационных осложнений.

Полученные результаты в будущем помогут совершенствовать подходы к ведению раневых дефектов слизистой оболочки полости рта, улучшая качество жизни стоматологических больных.

Данные, полученные в ходе исследования будут полезны специалистам в области экспериментальной хирургии, гистологии, стоматологии, челюстно-лицевой хирургии, а, значит, могут быть использованы в учебном процессе на кафедрах анатомии и гистологии, эмбриологии и цитологии для студентов лечебного, педиатрического и стоматологического факультетов.

Методология и методы исследования. Методологической основой исследования является сравнительное изучение структурно-функциональной организации слизистой оболочки полости рта 3-х месячных крыс линии Wistar на модели раневого дефекта в условиях закрытия раны полимерной пьезоэлектрической мембраной и без нее. В работе использован комплекс гистологических, иммуногистохимических, электронно-микроскопических, морфометрических и статистических методов исследования слизистой оболочки полости рта экспериментальных животных, который позволил охарактеризовать регенераторные процессы, происходящие на разных этапах раневого процесса.

Все процедуры с животными выполнялись в соответствии с директивой Европейского парламента №2010 от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей». Распределение объектов и групп исследования в соответствии с используемой методологией представлено в Таблице 1.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Использование полимерной пьезоэлектрической мембраны, особенно модифицированной медью, при хирургических вмешательствах на слизистой оболочке полости рта способствует полному перекрытию раны эпителиальным пластом и снижению воспалительной реакции уже на 3-и сутки исследования, а также миграции и дифференцировке клеток фибробластического ряда в область раневого дефекта на 7-е сутки, что индуцирует развитие грануляционной ткани на первых этапах заживления раны и рыхлой волокнистой соединительной ткани в дальнейшем.

2. При использовании раневого покрытия быстрее восстанавливается трофический аппарат в области повреждения, что выражается в образовании и созревании новых сосудов на 7-е сутки исследования и обнаружении нервных волокон на 12-е сутки в собственной пластинке слизистой оболочки полости рта, благодаря чему снижается риск развития маловаскуляризованной плотной волокнистой соединительной ткани, и, как следствие, возникновения рубцовой

деформации.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается выполнением работы на достаточном экспериментальном материале (60 экспериментальных животных) с использованием современных гистологических, электронно-микроскопических, иммуногистохимических и морфометрических методов исследования. Полученные результаты статистически обработаны с помощью современных методов доказательной медицины.

Основные научные данные и теоретические положения, разработанные на их основе, настоящего исследования интегрированы в процесс преподавания на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации для студентов лечебного, педиатрического и стоматологического факультетов.

В дальнейшем планируется клиническое исследование полимерных пьезоэлектрических мембран и регистрация способа лечения ран слизистой оболочки полости рта.

Основные материалы диссертации доложены и обсуждены на: XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Перспективы развития фундаментальных наук" (Томск, 2018), XVII Международной научно-практической конференции "Микитаевские чтения" (Нальчик, 2021), Общероссийской научно-практической конференции "Эстафета вузовской науки" (Москва, 2021), XVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Перспективы развития фундаментальных наук" (Томск, 2021).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 4 - в рецензируемых центральных научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации основных научных

результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора медицинских наук, 4 - в изданиях, входящих в базу Scopus и Web of Science.

Объем и структура диссертации. Диссертация представлена на 178 машинописных страницах, иллюстрирована 9 таблицами и 83 рисунками, состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов и списка литературы и списка иллюстраций. Список литературы содержит 177 источников, в том числе 24 на русском и 153 английском языках.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в разработке концепции, дизайна и планировании научного исследования. Им лично выполнена серия экспериментов *in vivo* с забором и подготовкой слизистой оболочки полости рта экспериментальных животных для световой и электронной микроскопии, проведены гистологические исследования. Статистическая обработка полученных результатов, оформление диссертации и автореферата выполнены лично автором.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Клинико-эпидемиологические аспекты развития раневого процесса в полости рта

Раневой процесс – часто встречающаяся патология в челюстно-лицевой хирургии. В ротовой полости он возникает в результате коррекции ряда врожденных аномалий, подготовки к хирургическому, ортопедическому и ортодонтическому лечению, удалению новообразований и др (Rigby M.H. et al., 2013).

Раневые дефекты формируются в результате вестибулопластики, которая представляет собой хирургическое вмешательство в преддверии полости рта, направленное на предупреждение возникновения патологических процессов в пародонте, рецессии десны, устранение логопедических проблем. Вестибулопластика проводится как подготовительный этап перед лоскутными операциями, если дно карманов располагается ниже переходной складки преддверия полости рта. Также она рекомендована по ортопедическим показаниям, если необходимо улучшить фиксацию съемного протеза и создать условия для создания клапанной зоны, углубив тем самым преддверие полости рта (McLaurin W.S. et al., 2020).

Распространена методика проведения вестибулопластики по Кларку на верхней челюсти, при этом на альвеолярном отростке остается обширная раневая поверхность, которая закрывается защитной повязкой (Shrestha B. Et al., 2021).

Методика по Эдлан-Мейхеру сочетается, как правило, с цистэктомией на нижней челюсти. В ходе операции также остается обширный раневой дефект, который закрывается перевязочным материалом до формирования фибриновой пленки (Mieler I. et al., 1986).

Существует методика пластики преддверия полости рта, где на место дефекта после иссечения рубцовой ткани укладывается лоскут слизистой

оболочки с щечной области длиной 6 см и шириной 3 см, при этом оставляется открытая рана в донорской области (Bayramicli M. et al., 1997).

G.Wimmer, E. Parsche предложили метод вестибулопластики с использованием послойного аутотрансплантата слизистой оболочки твердого неба с оставлением открытого раневого дефекта на месте донорского участка (Wimmer G. et al., 2000).

Также раневые дефекты формируются при оперативных вмешательствах для закрытия рецессии десны. Как правило, донорские участки тоже оставляют открытыми, и они заживают посредством вторичного натяжения. При наличии патологических зубодесневых карманов применяют операцию гингивэктомии, при которой иссекается десневой лоскут треугольной формы в области одного или нескольких зубов, который затем удаляют, а далее проводят кюретаж патологического кармана. Ввиду того, что дефект десны в последствии не закрывается, эта операция часто приводит к оголению корней зубов и рецессии десны (Prato G.P. et al., 2000).

Обширное иссечение мягких тканей в области полости рта происходит при удалении новообразований (Srivastava A. et al., 2020). Согласно данным ВОЗ, новообразования глотки, гортани и полости рта занимают 6-е место по распространенности злокачественных новообразований. Постоперационные осложнения после удаления новообразований полости рта встречаются достаточно часто. Нагноение послеоперационной раны встречается в 40-60% случаев, кроме того, опасно образование стойкого незаживающего постоперационного дефекта (Киселев И.Л. и др., 2013).

Для хирургического лечения пародонтитов и пародонтозов применяют лоскутные операции, суть которых заключается в отслаивании слизисто-надкостничного лоскута и закрытии ими имеющегося дефекта, при этом донорский участок остается открытым (Mutschelknauss R. et al., 1991).

Таким образом, существует ряд хирургических патологий в ротовой полости, лечение которых сопровождается пересадкой собственных тканей, донорский участок на месте которых затем оставляется открытым.

1.2. Морфологические аспекты заживления раневого дефекта слизистой оболочки ротовой полости

Раневой процесс — это комплекс биологических реакций организма, который возникает в ответ на повреждение органов и тканей, включающий восстановительные и деструктивные изменения и, в норме, заканчивающийся заживлением.

Долгое время в России господствовала классификация фаз раневого процесса по М.И. Кузину:

I фаза - воспаление. Подразделяется на период сосудистых изменений и период очищения раны от некротических тканей.

II фаза – регенерация. Характеризуется образованием и созреванием грануляционной ткани.

III фаза - реорганизация рубца и эпителизация (Кузин М.Н. и др., 1985).

Существует альтернативная классификация, которая пользуется популярностью за рубежом и часто встречается в научных статьях - классификация BYRP (Black, Yellow, Red, Pink). Она основывается на мнемонических принципах, при этом каждая стадия раневого процесса ассоциируется со своим цветом:

Black (черный) – некроз;

Yellow (желтый) - фибрин в ране;

Red (красный) - грануляционная ткань;

Pink (розовый) - эпителизация раны.

По результатам социологических исследований, классификация BYRP распространилась в России, многие хирурги считают ее более удобной и практичной (Привольнев В.В., и др., 2016).

Патогенетически процесс заживления раны включает в себя сложную последовательность взаимодействия между клетками – эпителиоцитами, тромбоцитами, эндотелиальными клетками, лейкоцитами, макрофагами, фибробластами и тучными клетками, - и биологически активными молекулами – факторами роста, цитокинами, межклеточным матриксом и микроокружением клеток (Hakkinen L. et al., 2015).

Заживление раны начинается с процесса коагуляции, в ходе которого происходит свертывание крови и остановка кровотечения (Serebryanaya N. B. et al., 2018, Gawaz M. et al., 2013, Golebiewska E. M., 2015).

Изначально происходит спазм сосудов, благодаря которому прекращается поступление крови в рану. Этот процесс возможен благодаря эндотелинам, выделяемым клетками эндотелия поврежденных сосудов. Также в этом участвуют катехоламины, тромбоксан А, брадикинин и другие активные вещества, выделяемые тромбоцитами. Через 20 минут рефлекторный спазм сосудов сменяется вазодилатацией, обусловленной гистамином, простогландами, лейкотриенами. В связи с этим на первый план выходит формирование фибринового сгустка. При травме активируется ряд систем плазмы, в процессе чего происходит каскад свертывания крови, который продуцирует тромбин и фибрин, образующих тромбоцитарно-фибринозную сеть, обеспечивающую гемостаз. Также тромбин стимулирует выработку агранул тромбоцитами, которые содержат факторы роста для заживления ран. Формирование фибринового сгустка необходимо не только для остановки кровотечения, но и для временного восстановления целостности защитного барьера (Быков В.Л., и др., 2019).

Выделение биологически активных веществ, являющихся малыми полипептидами, тромбоцитами необходимо не только для обеспечения гемостаза, но и для привлечения клеток воспалительного инфильтрата в рану. C5a фрагменты комплемента привлекают нейтрофилы и моноциты, а фрагменты разрушенного плазмином фибрина являются хемоаттрактантами для

макрофагов. Серотонин привлекает в рану нейтрофилы, усиливает активность макрофагов, способствует пролиферации лимфоцитов (Schoenichen C. et al., 2019).

Следующей является фаза воспаления продолжительностью 4-6 дней. На этом этапе запускается каскад межклеточного взаимодействия для ограничения раневого дефекта от микробной контаминации и подготовка к дальнейшей регенерации (Быков В.Л. и др., 2019). Она нацелена на ограничение раневого дефекта, содержащего некротизированные ткани, микроорганизмы и элементы первичного загрязнения, от остального организма, удаление патологических продуктов и ликвидацию последствий повреждения (Миронов В.В. и др. 2014).

В процессе воспаления важную роль играют нейтрофильные гранулоциты и мононуклеарные фагоциты. Нейтрофилы, которые первыми мигрируют в рану, обеспечивают очищение ее от микроорганизмов, при этом их активность обеспечивается кислотными радикалами, производимыми макрофагами. Также выделяя биологически активные вещества, они способствуют миграции других клеточных элементов в область дефекта. Вслед за ними в область раневого дефекта мигрируют макрофаги, которые утилизируют погибшие нейтрофилы и завершают процесс очищения раны. Кроме того, выделяя биологически активные вещества, они оказывают влияние на пролиферацию фибробластов, тем самым участвуя в процессе образования соединительной ткани (Arias J.I. et al., 2009).

Тучные клетки секретируют гистамин и гепарин, которые являются хемоаттрактантами для эндотелиоцитов и стимулируют секрецию коллагена фибробластами, поэтому на этом этапе тучные клетки практически не выявляются при помощи гистологических методов исследования из-за их дегрануляции. Выделяя вышеупомянутые медиаторы, тучные клетки играют важную роль не только в развитии отека и ограничении раневого дефекта, но и в последующей регенерации (Sen C.K., 2009).

В результате возникновения отека, нарушается тканевой обмен и кислотно-щелочное равновесие, что ведет к активации плазмоцитов и лимфоцитов в ране, которые за счет выделения биологически активных веществ дополнительно привлекают в рану клетки воспалительного инфильтрата и сами участвуют в уничтожении микроорганизмов (Serebryanaya N. B. et al., 2018, Gawaz M. et al., 2013, Golebiewska E. M., 2015).

Параллельно со стиханием воспалительных реакций начинается фаза пролиферации и роста тканей. Она длится в течении 2-3 недель, достигая своего пика на 10-е сутки. Она включает в себя образование эпителиального пласта, соединительной ткани и сосудов.

Образование соединительной ткани в ране контролируется макрофагами, которые трансформируются из воспалительных M1-клеток в репаративные M2-клетки, и выделяемые ими факторы создают в ране уникальные условия в виде гипоксии, гипогликемии и ацидоза, что является неотъемлемым условием ангиогенеза. Кроме того, макрофаги привлекают в рану фибробласты – основные клетки регенерации соединительной ткани (Шаповалова Е., 2019).

При заживлении открытых ран большую роль играет контракция раны - стягивание ее краев, в которой принимают участие миофибробласты, которые образуются в результате пролиферации фибробластов (Наккинэн L. et al., 2015). Они имеют длинные отростки и микрофиламенты в цитоплазме. Миофибробласты принимают участие в синтезе коллагена III типа и активно сокращаются под действием серотонина, ангиотензина и норадреналина, вызывая контракцию раны (Tai Y. et al., 2021).

Ангиогенез происходит под действием тромбоцитарных и макрофагальных хемоаттрактантов, митогенов, выделяемых тучными клетками, которые вызывают миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток. Процесс ангиогенеза завершается образованием базальной мембраны сосудов (Ribatti D. et al., 2013).

Эпителизация является одним из основных процессов, определяющих заживление раны, это обусловлено тем, что целостность эпителиального пласта является важным фактором резистентности организма к действию чужеродных агентов. Эпителизация раны начинается в первые часы после повреждения. Источником мигрирующих эпителиоцитов является покровный эпителий по краям раны. Запускают процесс миграции как биологические активные вещества, выделяемые самими эпителиоцитами, так и клетками воспалительного инфильтрата (Freedberg I. M. et al, 2001). Миграция эпителиоцитов обеспечивается сокращением внутриклеточных актомиозиновых филаментов, и исчезновением десмосом, сцепляющих клетки между собой, и полудесмосом, фиксирующих их к базальной мембране. При этом сохранение межклеточных контактов необходимо для коллективной миграции эпителиоцитов, что обеспечивает сохранение общей структуры восстанавливаемой ткани (Andersen L., 1980). Средняя скорость миграции эпителиоцитов составляет 1,5 мкм/мин (Ben Amar M. et al., 2014).

Базальные клетки эпителия уплощаются, увеличиваются в размерах, становятся менее дифференцированными, внутри них содержится меньше органелл. Эпителиоциты формируют псевдоподии на краю, обращенном к ране. Псевдоподии могут быть широкими и плоскими ламеллоподиями или узкими и длинными филоподиями (Trepap X. et al., 2012). При соприкосновении филоподий и ламеллоподий клеток с разных краев раны по центру в них происходит разрушение актиновых филаментов с формированием межклеточных адгезивных соединений (Omelchenko T. et al., 2003). После того, как рана затянулась однослойным эпителием, возможно продолжение миграции эпителиоцитов, а также пролиферация имеющихся клеток - эпителий становится многослойным, восстанавливаются десмосомы и нормальный фенотип клеток, формируется базальная мембрана, полное восстановление которой является признаком успешной эпителизации (Hakkinen L. et al., 2015, Koivisto L. et al., 2012). По мере дифференцировки количество слоев эпителия увеличивается,

клетки приобретают типичные размеры и формы. При этом первые 3-4 недели в области раневого дефекта в эпителии отсутствуют меланоциты, клетки Меркеля и клетки Лангерганса (Kagami A. et al., 2010). Через 60 суток гистологически эпителий не отличается от эпителия неповрежденной слизистой оболочки (Hakkinen L. et al., 2015).

Таким образом, начало восстановления многослойного строения эпителия невозможно без полного закрытия раневого дефекта слоем эпителиоцитов, следовательно, хирургическое сближение краев раны и ее закрытие раневыми покрытиями благоприятно сказывается на эпителизации, и, как следствие, на регенерации в общем (Stenn K. S. et al., 1988).

Для процесса нормальной регенерации помимо стимулирующих факторов необходимо тормозное влияние, которое обеспечивается лимфоцитарными интерферонами, угнетающими синтез коллагена, и макрофагальными интерферонами а и b, простогландином E. В дальнейшем это будет способствовать перестройке соединительной ткани и снижать вероятность развития рубцовой ткани (Des Jardins-Park H. E. et al., 2019).

Заключительная стадия, перестройка соединительной ткани, происходит в течение многих месяцев, при этом формируются более тонкие и упорядоченно расположенные волокна соединительной ткани, из которой исчезает большая часть сосудов и клеток (Des Jardins-Park H. E. et al., 2019). На стадии реорганизации рубца большое значение имеет взаимоотношение между тучными клетками и фибробластами. При повышенном содержании первых наблюдается выраженное образование фиброзной ткани и формирование келлоидных рубцов (Van der Veer W.M. et al., 2009).

Также в перестройке рубца принимают участие плазмоциты и лимфоциты, которые инициируют прекращение пролиферации фибробластов (Супильников А.А., и др., 2016). Повышенное содержание на данном этапе макрофагов является плохим прогностическим признаком, так как ведет к образованию рубца (Rodero M.P. et al., 2010).

Для выбора оптимальной тактики ведения раневого дефекта необходимо учитывать тип заживления раны: первичным, вторичным натяжением или под струпом. Заживление первичным натяжением характерно для небольших раневых дефектов, оно протекает быстро и без осложнений. В этом случае полость раны образуется в результате комбинации травмы и ишемического повреждения тканей по краям раны, вызванного тромбозом и разрывами сосудов в области раны. В ходе первичного натяжения между краями раны образуется тонкий слой грануляций, который затем заменяется соединительной тканью. Фибрин и фибриноген в этом случае образуют первичный волокнистый каркас с высокой сорбционной активностью, который, в среднем, на 6-8 сутки замещается новообразованной соединительной тканью, уплотняющейся в виде рубца (Salcido R. et al., 2017).

В случае вторичного натяжения невозможна первичная спайка тканей ввиду отсутствия плотного прилегания стенок раны друг к другу. В данном случае процесс регенерации сопровождается ярко выраженным воспалением, формированием обширной по объему грануляционной ткани и последующим образованием глубокого рубца. Обширный отек в первые часы после травмы сменяется нагноением с выходом белков крови и лейкоцитов в просвет раны, отвечающих за лизис некротических масс. После воспалительной реакции рана заполняется грануляционной тканью, богатой молодыми капиллярами, располагающимися перпендикулярно поверхности слизистой оболочки и образующими аркадные петли. Грануляционная ткань замещается фиброзной тканью (Zamad. M. et al., 2018).

Обширные, постоянно травмируемые и обсеменяемые микроорганизмами раны заживают с образованием соединительнотканного рубца, в зоне которого исчезают сосочки, слюнные и слюнные железы. В его состав входят грубые коллагеновые волокна, фиброциты, лежащие параллельно поверхности раны (Kumar V. et al., 2015, Reinke J. M. et al, 2018, Teller P. et al., 2009, Wang P. H. et al., 2018).

Заживление под струпом характерно для ссадин, царапин и небольших ожогов. Заживление начинается со свертывания крови или лимфы и образованием струпа, под которым происходит регенерация тканей, после чего струп безболезненно отторгается (Аксенов К.А. и др., 2008).

Также для прогнозирования течения раневого процесса и выбора тактики ведения ран необходимо учитывать характер раны в зависимости от ее загрязненности:

Чистая рана: <5% загрязнения;

Условно чистая рана: <10% загрязнения;

Загрязненная рана: 20-30% загрязнения;

Грязная рана: >30% загрязнения (Onyekwelu I. et al., 2017).

Следует принять во внимание, что согласно данной классификации, любая рана полости рта относится к условно чистым или загрязненным ранам по причине постоянной колонизации микроорганизмами полости рта. По последним данным, в полости рта человека выявляется 700-1000 видов микроорганизмов, примерно 100 видов грибов и множество видов вирусов. Общее количество микрофлоры достигает до 1 млрд/мл (Krishnan K. et al., 2017). При этом, микроорганизмы способны негативно влиять на регенерацию раны, в особенности на ее эпителизацию (Bhattacharya R. et al, 2014).

Хирургические раны в полости рта обладают следующими особенностями:

- Высокая первичная микробная колонизация раны с последующей контаминацией при открытом дефекте;
- Негативное влияние пищевого комка и других раздражителей, обеспечивающих механическую травматизацию раневой поверхности;
- Избыточное натяжение в мягких тканях при заживлении раны;
- Постоянное смачивание раны слюной, содержащей защитные ферменты и способствующей более легкой миграции клеток в

область раневого дефекта (Brand H. S. et al., 2013, Hakkinen L. et al., 2015, Politis C., 2016).

Кроме того, наблюдается визуальное несоответствие размеров раны на коже (большие размеры) и слизистой оболочке (меньшие размеры), так как последняя обладает большей подвижностью и эластичностью.

Следует также учитывать особенности течения раневого процесса в зависимости от его локализации в полости рта. Например, при ранении твердого неба невозможно обеспечить сближение краев раны из-за плотного сращения слизистой оболочки с надкостницей, а ранения ретромолярной области или дна полости рта сопровождаются обильным кровотечением и развитием отека из-за высокой васкуляризации (Suzuki Y. et al., 2021).

Также необходимо учитывать, что для оптимизации процесса регенерации раневого дефекта слизистой оболочки полости рта необходима постоянная смена одних популяций клеток другими. При выраженной воспалительной клеточной реакции в ране создаются благоприятные условия для адгезии микробов, ввиду миграции в нее макрофагов (Kim H.S., 2014).

Особенности течения различных этапов раневого процесса, тип заживления раны и особенности локализации раневых дефектов слизистой оболочки полости рта необходимо учитывать при планировании оперативного вмешательства и методики ведения раневого дефекта.

1.3. Обзор существующих материалов для закрытия раневых дефектов

Для предотвращения инфицирования, развития контрактуры тканей и рубцевания необходимо перекрывать раневой дефект защитными раневыми повязками (Vasnati A. et al., 2016). Это возможно сделать, используя аутогенные материалы, такие как лоскуты буккального жирового тела, языка, твердого неба на ножке, височной фасции, носогубной области. Так же используются лоскуты из с области предплечья и бедра (Singh G. et al., 2018). Однако такие

трансплантаты дают плохой послеоперационный прогноз в результате формирования негативных эстетических и функциональных нарушений в донорской области (Mittal G. et al., 2018). Замечено, что раны на донорских участках вызывают гораздо более сильную послеоперационную боль, чем на первичных реципиентных областях. Даже при больших внутриротовых онкологических резекциях пациенты сообщают о более сильном дискомфорте в донорской области, которое отмечается как болезненное ощущение «дорожной сыпи», которое в некоторых случаях может сохраняться в течение нескольких месяцев после операции (Solanki N.S. et al., 2012). Кроме того, донорские раны производят гемосерозный экссудат, который может потребовать повторных перевязок до тех пор, пока не будет достигнута полная эпителизация раны. Пациенты жалуются на постоянную боль во время наложения и смены повязок в течение нескольких дней или недель после операции (Assadian O. et al., 2015).

Донорские участки также подвержены инфекции, если экссудат не удерживается повязками, что может потребовать их более частую замену и продлить время заживления, а также повлечет необходимость назначения пероральных и местных антибиотиков, что еще больше усилит дискомфорт пациента (Bailey S. et al., 2011).

Кроме того, мягкие ткани, покрывающие альвеолярную кость, относительно тонкие, в слизистой оболочке полости рта нет жирового слоя, поэтому васкуляризированный кожный лоскут в большинстве случаев оказывается слишком крупным и маломобильным, и его цвет не соответствует цвету окружающих тканей (Soutar D.S. et al., 1983).

Более предпочтительным, в таком случае, является использование донорских тканей с челюстно-лицевой области. Наиболее популярной методикой лечения при закрытии рецессии десны является пересадка трансплантата с твердого неба, который по толщине и цвету соответствует слизистой оболочке с других участков ротовой полости (Kloukos D. et al., 2018)

Его недостатком является травматизация донорского участка, недостаточность используемых мягких тканей и плохой постоперативный прогноз (Urban I.A. et al., 2019). Также, поскольку трансплантат слизистой оболочки неба является свободным трансплантатом без сосудистой ножки, он не показан для реципиентных областей с плохой васкуляризацией (Sadig W. et al., 2004).

Использование латерального язычного лоскута для закрытия дефектов слизистой оболочки полости рта обладает рядом положительных аспектов, в том числе надежной перфузией лоскута из-за его богатой сосудистой сети, близким сходством с соседними тканями и технической простотой манипуляций (Fujiwara K. et al., 2020). Однако эта методика не получила широкого распространения из-за опасности нарушения функций языка (Kumar V. et al., 2019). Также использование свободных лоскутов имеет свои ограничения, в основном, с точки зрения стоимости, потребности в микрохирургическом опыте и послеоперационном уходе, а также наличия сопутствующих заболеваний, препятствующих проведению длительных операций (Yoon C.S. et al., 2017).

Имеются данные об использовании жирового комка щеки на ножке для закрытия раневых дефектов слизистой оболочки полости рта. При наличии неповрежденного эпителия жировой комок на ножке можно использовать для закрытия аутогенного свободного костного трансплантата или титановой сетки с частицами кости на противоположной стороне верхнечелюстной пазухи. Поскольку слизистая оболочка верхнечелюстной пазухи тонкая и ее часто повреждают во время операции по удалению опухоли, хорошо васкуляризированный жировой комок может ее заменить для покрытия костного трансплантата. Для лечения дефектов, вызванных злокачественной опухолью и лучевой терапией, его можно на обнаженных некротизированных костных дефектах. Хотя было много примеров успешного применения щечного трансплантата для реконструкции, этот метод также имеет ряд ограничений. Размеры дефектов, превышающие 4 см × 4 см, имеют более высокую частоту постоперационных осложнений. Ряд авторов также советуют не

использовать его для закрытия дефектов размером более 6 см × 4 см. Наиболее частым осложнением был разрыв мягких тканей с последующим формированием послеоперационного свища. Также при чрезмерном взятии тканей для трансплантата возможно опускание щеки (Kim M.K. et al., 2017).

В последнее время появилось большое количество синтетических материалов для закрытия раневых поверхностей, в том числе и на слизистой оболочке полости рта, использование которых способствует более быстрой регенерации тканей. В результате их применения значительно сокращаются сроки и улучшаются результаты лечения - ускоряется динамика уменьшения размера раны, индуцируется эпителизация и образование соединительной ткани с кровеносными сосудами, происходит защита от микробного обсеменения и травматического воздействия. Особенно актуальным направлением является разработка перевязочных материалов, которые были бы эффективны на первой стадии раневого процесса, так как в этот период необходимо обеспечить значительные сорбционное, антимикробное и обезболивающее действия.

Фундаментальными в области исследования перевязочных материалов являются работы Георга Винтера, выполненные в середине прошлого столетия. В ходе эксперимента на свиньях, он доказал, что, во-первых, влажные раны заживают в два раза быстрее сухих, а во-вторых, лечение ран под повязками способствует более быстрому восстановлению тканей (Winter G.F. et al., 2017).

Следующим этапом развития учения об использовании раневых покрытий стал дифференциальный подход к ведению раны в зависимости от стадии регенерации дефекта. В начале XXI века получила распространение теория обработки раны Wound bed preparation, стали изучаться варианты перевода хронической раны в острую. Было установлено, что в экссудате хронических ран содержится высокий уровень протеаз, и что клетки краев и основания хронических ран фенотипически несостоятельны. Таким образом, перевязочный материал способствует созданию оптимальной среды для репаративных процессов (Sibbald R.G. et al., 2021).

Современные перевязочные материалы классифицируются в зависимости от материала изготовления, структуры, стадии раневого процесса, модификации лекарственными средствами, способа изготовления, лечебных свойств, назначения. Они бывают животного (коллаген, фибрит, хитин), растительного (альгинат, агар-агар) и синтетического (полиуретан, полиэтилен, полипропилен, полисилоксаны, полиэтилакрилат) происхождения. Выделяют биodeградируемые покрытия на основе природных и биоинертные на основе синтетических компонентов. Положительным аспектом использования биodeградируемых материалов является отсутствие необходимости их снятия по завершении лечения. По форме изготовления покрытия подразделяются на губки, пленки, гели, аэрозоли, мази (Abdo J. et al., 2020).

При этом не существует идеального перевязочного материала, который бы обладал следующими свойствами:

- Универсальность применения;
- Защита раневой поверхности от травматизации;
- Антибактериальное действие;
- Прогнозируемость результатов;
- Защита от высыхания и потери физиологических жидкостей (электролитов);
- Сохранение оптимального микроклимата раны;
- Отсутствие канцерогенного и мутагенного эффектов;
- Низкая стоимость;
- Простота использования;
- Адаптация к любой поверхности;
- Отсутствие необходимости в частой смене материала (Broussard K.C. et al., 2013).

Раневое покрытие должно иметь определенное строение. Многослойность материала обеспечивает разнонаправленность его функций. Так, наружный слой способствует защите раны от внешних воздействий, средний обеспечивает

сорбционные свойства, а внутренний - максимальное повторение контуров раны (Rezvani Ghomi E. et al., 2019).

Особое внимание уделяется составу внутреннего слоя материала. При его гидрофобности уменьшается риск прилипания материала к ране и, как следствие, снижается риск последующей повторной травматизации при его снятии, но в то же время не происходит дренаж экссудата, в результате он быстро распространяется под повязкой, вызывая мацерацию. В этом случае возможна модификация конструкции материала - перфорированный внутренний слой обеспечит отток экссудата, при этом сокращая риск прилипания к ране. Данную технологию используют при производстве повязок H-A Dressing (USA) и Melolin (New Zealand) (Graça M.F.P. et al., 2020). В качестве сорбентов для промежуточного слоя используются целлюлоза, полиэтиленгилколь, акриловая кислота, графит, хитозан. Отток экссудата происходит за счет необратимого испарения, отделяемого из раны благодаря капиллярному дренированию и сорбции микрофлоры. Эвакуация экссудата из раны препятствует обратному всасыванию продуктов распада и нормализует осмотическое давление за счет элиминации ионов Na^+ и K^+ (Бледнов А.В. и др., 2006).

Внешний слой должен обеспечивать контролируемую газо- и паро-проницаемость. Скорость испарения жидкости через повязку должна составлять примерно 1400 г/м²/сутки. Это можно достичь благодаря уплотнению внешней поверхности за счет горячего прессования (Ефименко Н. А. и др., 2002).

Доказанной эффективностью обладают материалы на основе наноконструированного терморасширенного графита. За счет особенностей строения материала с толщиной слоев 10 нм и размером пор от 1 нм до 10 мкм, в состав которого входят частицы длиной до 6 нм, обеспечивается высокая поглотительная способность экссудата до 8000-26000%. Эти конструкционные особенности обеспечиваются методикой его изготовления путем термического нагрева интеркалированных соединений фторированного графита. В ходе цитологического исследования было установлено, что уже на 1-2 сутки

исследования при использовании материала в мазках-отпечатках раны превалировали эритроциты, микрофлора отсутствовала, а лейкоциты с признаками деструкции не превышали 25% от общего количества клеточных популяций в экспериментальной группе, тогда как в группе с закрытием раневого дефекта ватно-марлевыми повязками процентное соотношение лейкоцитов с признаками деструкции составляло 35%. Воспалительно-регенераторный тип цитогрaмм фиксировался на 3-5, а регенераторный на 6-8 сутки в экспериментальной группе. В контрольной группе эти сроки составляли 7-9 и 9-12 сутки соответственно. Несмотря на то, что использование данного материала обеспечивало эффективный вертикальный дренаж раны, сам по себе он не способствовал индуцированию репарационных процессов (Рязанцева Н.В. и др., 2009).

Мембрана Integra® (Integra LifeSciences, Plainsboro, New Jersey) нашла широкое применение для реконструкции внутриротовых хирургических дефектов, которые не требуют дополнительной коррекции регионарным или свободным лоскутом. Она представляет собой двухслойную матрицу с внутренним пористым слоем, состоящим из сшитого бычьего коллагена и хондроитин-6-сульфата гликозаминогликана, и внешним, состоящим из тонкого нерассасывающегося полупроницаемого полисилоксана. Биоразлагаемый пористый слой из бычьего коллагена служит каркасом для клеточной инвазии и роста капилляров. Силиконовый слой обеспечивает гибкое адгезивное покрытие раневой поверхности, которое контролирует потерю влаги из раны и увеличивает прочность матрицы на разрыв. Поскольку этот слой не резорбируется, он удаляется из дефекта, что может приводить к заживлению дефекта посредством вторичного натяжения из-за повторной травматизации (Rua Gonzalez L. et al., 2018).

Аутогенные трансплантаты обычно хрупкие и могут легко порваться при подшивании к прилегающей слизистой оболочке полости рта, в то время как силиконовый слой двухслойного раневого матрикса Integra® увеличивает его

прочность на разрыв и упрощает работу хирурга. Кроме того, заменитель кожи Integra® обеспечивает интеграцию юных фибробластов в биоразлагаемом коллагеновом слое (Beech A. et al., 2016).

Отмечалось, что реконструкция хирургических дефектов с помощью заменителей кожи Integra® была успешной, когда адекватная иммобилизация матрицы относительно реципиентного сосудистого ложа была достигнута с помощью хирургической шины, валика или стабилизирующего шва. Кроме того, репозицию матрицы лучше всего было проводить, поднимая ее от ложа трансплантата вместо перемещения по плоскости, чтобы избежать повреждения пористого слоя коллагена. Также следовало избегать загрязнения матрицы Integra® продуктами на нефтяной основе, такими как ксероформная марля, которые обычно используются при работе с аутогенными кожными трансплантатами (Srivastava A. et al., 2020).

Авторы наблюдали образование грануляционной ткани и множественных сосудов через неделю использования материала (Beech A. et al., 2016). Однако, полученные данные не могут быть полностью корректными, так как послеоперационное наблюдение пациентов было нерегулярным (Srivastava A. et al., 2020).

В научной литературе редко упоминается данный материал, а последнее исследование включало всего 6 клинических случаев наблюдения пациентов с раневыми дефектами, закрытыми матрицей Integra®. Также к недостаткам можно отнести высокую стоимость его изготовления (Hulsey A. et al., 2016).

Существуют данные об использовании полимерной матрицы Реперен для закрытия дефектов слизистой оболочки полости рта. Он представляет собой двуслойную неперфорированную пленку, основой которой является полимер, сшитый из олигомеров метакрилового ряда. Особенности строения данной полимерной матрицы - наличие поверхностного слоя из предельных углеводов, имитирующих поверхность клеточной мембраны - обеспечивают высокую адгезию стволовых мезенхимальных клеток к матрице, стимулируя

пролиферацию и дифференцировку собственных тканей. Реперен не оказывает аллергического воздействия на организм, не вызывает воспалительных реакций и предотвращает образование рубцовой соединительной ткани (Рябова Д.А. и др., 2016).

В ходе исследования материала производился забор соединительнотканного лоскута с твердого неба, после чего дефект закрывался полимерной матрицей Реперен. При гистологическом исследовании использование полимерной матрицы Реперен уже на 5-е сутки эксперимента приводило к активному образованию грануляционной и соединительной ткани, исчезновению лимфогистиоцитарной инфильтрации, когда в группе без лечения наблюдались обширные очаги некроза и только начальные признаки регенерации. На 7-е сутки слизистая оболочка под матрицей Реперен соответствовала по внешнему виду интактной, гистологически отмечалось замещение дефекта нежной волокнистой соединительной тканью. В ходе цитологического исследования мазков-отпечатков раны было выяснено, что эпителизация раневого дефекта наступала в два раза быстрее при использовании полимерной матрицы. Однако отсутствуют данные о возможности модификации этой мембраны различными лекарственными средствами (Рябова Д.А. и др., 2016).

Также доказанной эффективностью обладают защитные мембраны из коллагена (Pandey A. et al., 2020). Одним из преимуществ данного вида материалов является то, что он создает благоприятные условия для заживления при соприкосновении с раневым дефектом и защищает его от бактериальной инвазии (Singh G. et al., 2018), а также является хемоаттрактантом для эндотелиальных клеток и фибробластов, что способствует снижению интенсивности воспалительного процесса и ускорению регенерации (Reddy Y.R. et al., 2012, Shanmugam D. et al., 2019).

Использование коллагеновых матриц при раневых дефектах у пациентов снижает выраженность болевого синдрома, способствует гемостазу, ускоряет

образование грануляционной ткани и эпителия (Rastogi S. et al., 2006, Vastani A. et al., 2016, Jasthi C.V. et al., 2018, Bandekeri J.S. et al., 2021, Kothari S. et al., 2021).

Клиническое применение резорбируемой коллагеновой матрицы RCM для устранения рецессии десны, вестибулопластики и реконструкции альвеолярного гребня показало хорошие результаты в виде образования соединительной ткани на месте имеющихся дефектов, упростив процедуру оперативного вмешательства и уменьшив его объемы. (Васильев С.Ю., 2012). Исследования, проведенные относительно эффективности ее применения, в основном, касаются костной ткани (Furuhata M. et al., 2021), что же касается раневых дефектов и пластики мягких тканей, то в этом случае выборка клинических случаев не была статистически значимой и не включала в себя гистологические исследования (Васильев С.Ю., 2012).

Также по данным последних исследований коллагеновые матрицы не обладают всеми признаками идеального трансплантата из-за сложности его модификации дополнительными лекарственными веществами (Kumar S., et al., 2021).

Усовершенствованной методикой применения коллагеновой мембраны является ее припайка по краям раневого дефекта посредством лазера (Birkelbach M.A. et al., 2020). Для качественной припайки материала необходимо, чтобы он был прозрачным и проницаемым для лазерного луча, для соблюдения этого условия используется коллаген, полученный из перикарда свиньи. Кроме того, он должен быть стабильным, биосовместимым и биоразлагаемым.

Последние исследования показали, что мембрана, и биоадгезив, который используется для ее лучшей фиксации к краям раны являются цитосовместимыми с тканями человека. Жизнеспособность и пролиферация фибробластов, культивируемых в средах, инкубированных в течение 3 дней с мембраной и биоадгезивом с лазерным облучением, были сопоставимы с таковыми у клеток, выращенных в средах без контакта с материалами. Основываясь на этих результатах *in vitro*, можно сделать вывод,

что недавно разработанные коллагеновые мембраны, а также полная система фиксации не вызывают нежелательных клеточных реакций со стороны реципиента. Тем не менее у данной методики есть ряд недостатков. Для припайки матрицы к поверхности раны необходимо использовать специальные адгезивы и клеи, которые могут образовывать промежуточный слой, а это увеличивает стоимость лечения. Локальное повышение температуры и связанное с этим повреждение тканей препятствует широкому применению материала в челюстно-лицевой хирургии. Несколько исследований показали, что неравномерный и недостаточный контроль над распределением температуры может вызывать негативные последствия, такие как карбонизация. Также еще отсутствуют данные доклинических исследований на животных относительно эффективности использования данной методики (Gueldenpfennig T. et al, 2020)

Возможно использование защитных мембранных листов из собственных клеток организма (Roh J. L. et al., 2017).

Имеются данные о положительной динамике течения постоперационных ран слизистой оболочки полости рта после удаления новообразований при использовании мембраны на основе аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами. Из мембраны после разрушения тромбоцитов выделяются альфа-гранулы, которые содержат трансформирующий фактор роста-бета (TGF- β), фактор роста эндотелия сосудов (VGFF) и эпидермальный фактор роста (EGF), тем самым способствуя снижению нейтрофильной инфильтрации и окислительного стресса, увеличивая митотический индекс и способствуя образованию коллагена и формированию сосудов. Содержимое альфа-гранул обладало синергичным взаимодействием с клетками пациента, что обуславливало специфические реакции пролиферации, клеточной миграции и образование экстрацеллюлярного матрикса. В результате ее использования снижалось количество возникновения постоперационных осложнений, возможность приема пищи естественным образом возвращалась в короткие сроки, сокращалась длительность госпитализации после операции до 5 дней (Киселев И.Л. и др., 2013). Также при

ее использовании наблюдался ускоренный гемостаз и снижение выраженности воспалительной реакции и болевого синдрома. Ограничительным фактором ее использования является наличие хронических заболеваний и снижения иммунной резистентности у пациентов, у которых планируется забор плазмы. Также существует опасение, что при реконструктивных операциях использование мембраны может приводить к развитию онкологических заболеваний, так как альфа-гранулы содержат факторы роста (Медведев В.Л. и др., 2020).

Полимерные мембранные листки из фибробластов собственной пластинки и эпителиальных клеток слизистой оболочки полости рта являются эквивалентами интактных тканей области, подлежащей восстановлению. Эпителиальный слой клеточного пласта включает от двух до четырех слоев кубовидных ядерных эпителиальных клеток с вкраплениями удлиненных клеток. Субэпителиальный слой матрицы включает фибробласты, эндотелиальные клетки и фибрин, встроенные в каркас, подобный структурам внеклеточного матрикса слизистой оболочки полости рта. Эпителиальный слой включает верхний слой кератиноцитов и нижний слой фибринового матрикса без каких-либо клеток (Kinikoglu B. et al., 2011).

Изготовление мембранных листков состоит из культивирования фибробластов и эндотелиальных клеток, которые смешиваются между собой, а затем к ним добавляются кератиноциты. Через пять дней полученный слой клеток слизистой оболочки подготавливают к трансплантации. Мембранные листки продемонстрировали свою эффективность в ускорении заживления хирургических ран языка у крыс. В дополнение к внутриоральному использованию мембранные листки слизистой оболочки полости рта применяются для роговицы и мочевыводящих путей. (Roh J. L. et al., 2017).

Макроскопическое и гистологическое заживление ран полости рта, покрытых мембранным листком, происходит быстро и естественно. Фибробласты в созданных *in vitro* трансплантатах способствуют образованию

грануляционной и рыхлой волокнистой соединительной ткани. Мембранные листки также улучшают неоваскуляризацию раны и предотвращают развитие чрезмерной воспалительной реакции, что в конечном итоге приводит к более естественному процессу заживления (Lee J. et al., 2017).

К недостаткам материала относят тот факт, что посттрансплантационная выживаемость трансплантатов или тканеинженерных клеточных пластин зависит от хорошей васкуляризации в зоне ранения. В первые дни после травматизации, кровообращение в ране нарушено, наблюдается венозный застой, что приводит к гипоксическому и ишемическому повреждению трансплантата и его отторжению (Moschouris K. et al., 2016).

Бесклеточный кожный матрикс (ADM), полученный из аллогенной кожи человека, был предложен в качестве альтернативного подхода к лечению ран слизистой оболочки полости рта. После удаления содержащего кератин эпидермиса дермальный слой обрабатывался для удаления всей ДНК без нарушения целостности коллагеновой матрицы. Этот препарат обеспечивает инфильтрацию клеток-хозяев, неоваскуляризацию и эпителизацию без отторжения трансплантата. В ходе исследования использовался коммерчески доступный ADM в качестве замены аутологичным расщепленным кожным трансплантатам для закрытия внутриротовых раневых дефектов у 29 пациентов. Общий показатель успеха составил 90%, при этом во время клинической оценки была отмечена полная эпителизация в течение 4 недель. Клиническое применение ADM дало многообещающие результаты и высокие показатели успеха (Xu X. Et al., 2018).

Кроме того, наблюдалось снижение воспалительной реакции по сравнению с контрольной группой, где раневой дефект был открытым, что было отмечено небольшой численной плотностью воспалительных клеток и хорошо организованной соединительной тканью в группе с ADM. В представленном исследовании также была отмечена быстрая реваскуляризация в дефектах, перекрытых ADM, в течение 1 недели. Механизмы, лежащие в ее основе,

наблюдаемые при использовании трансплантатов ADM по сравнению с необработанными ранами были связаны с более высокой экспрессией VEGF в группе, где она использовалась, по сравнению с контролем через 2 и 4 недели после операции.

В данном исследовании также было замечено, что белок GLUT1 был сильно экспрессирован в группе с использованием ADM по сравнению с необработанными ранами, что являлось отражением процесса эпителизации раны.

Однако текущее исследование имело следующие ограничения: оно проводилось на отдельных животных, и индивидуальная гетерогенность не учитывалась; единственные выполненные гистологические анализы включали только окрашивание гематоксилином и эозином, в то время как использование более специфических красителей могло бы дать дополнительную информацию. (Xu X. et al., 2018).

Использование мембраны с концентрированным фактора роста (CGF) может увеличить толщину десны при закрытии рецессий и усилить послеоперационную стабильность после периодонтальной ускоренной остеогенной ортодонтии. CGF оказывает сильное влияние на пролиферацию и миграцию клеток фибробластического ряда, а также на экспрессию ангиогенных и специфических для фибробластов факторов в зависимости от своей концентрации. CGF является потенциальным источником для тканевой инженерии, поскольку он легко, а также для его получения применяются малоинвазивные методики, что делает его перспективным для регенерации тканей слизистой оболочки полости рта. Тем не менее, детальные механизмы, участвующие в регенерации ткани десны в микроокружении CGF, еще не изучены (Rezvani Ghomi E. et al., 2019).

Также возможно использование синтетических материалов для закрытия раневых поверхностей, которые активно используют при направленной регенерации тканей. По определению American Academy of Periodontology

направленной регенерацией тканей называют лечебные мероприятия, направленные на восстановление структур пародонта благодаря избирательному воздействию на его компоненты. Направленную тканевую регенерацию проводят при рецессии десны, отказе пациента от использования дополнительного хирургического доступа, при дентальной имплантации (Urban I.A. et al., 2019).

В ходе направленной тканевой регенерации используются барьерные мембраны, которые предупреждают врастание эпителия и соединительной ткани в область устраняемого костного дефекта. В качестве основы для этих мембран используются политетрафторэтилен, который в перспективе может использоваться и как раневое покрытие (Naung N.Y. et al., 2019).

1.4. Характеристика нетканых материалов на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом

Одним из современных перевязочных материалов является Gore-Tex[®], который широко применяется в челюстно-лицевой хирургии как эффективный барьерный и ранозаживляющий материал (Godin M., et al., 2003). В частности, исследования показали, что применение Gore-Tex[®] мембраны на месте раневых дефектов, образовавшихся после извлечения премоляров, позволяет избежать атрофии костной ткани (Tiefengraber J. et al., 2002).

В качестве материала для таких мембран используют полимер тетрафторэтилена (ТеФЕ), обладающий биосовместимостью и отличной химической стойкостью (Shao H.J. et al., 2009, Hou W., et al., 2009). Кроме того, полимер тетрафторэтилена термостоек и сохраняет молекулярную структуру даже при высоких значениях температур (Nasef M.M., 2000). Тем не менее, ему присущи относительно низкие значения клеточной пролиферации (Neuss S. et al., 2009).

В лаборатории гибридных биоматериалов Национального исследовательского Томского политехнического университета была получена

полимерная мембрана с пьезоэлектрическими свойствами. В ходе исследования полученных мембран было установлено, что добавление в структуру полимерной ТеФЭ цепи полимера винилиденфторида (ВДФ) позволяет придать ему пьезоэлектрические свойства, которые благоприятно влияют на пролиферацию клеток (Volbasov E.N. et al, 2016).

Полимер винилиденфторида характеризуется химической инертностью и хорошими показателями растворимости в апротонных растворителях (Simone S. et al., 2010, Kim J.F. et al., 2016). В ряде работ было отмечено, что полимерные нетканые материалы, содержащие в своем составе полимер винилиденфторида (ВДФ), могут применяться в качестве материала для ранозаживляющих мембран (Guo H.F. et al., 2012, Weber N. et al., 2010). Это связано с положительным влиянием пьезоэлектрических свойств ВФД-содержащего полимерного материала на скорость регенерации тканей. (Guo H.F. et al., 2012).

Наиболее полярной фазой для полимера ВДФ является пьезоэлектрическая β -фаза. В такой структуре полимерные молекулы ВФД ориентируются в одном направлении и проявляют отличительно сильные пьезоэлектрические свойства. Однако для формирования β -фазы в полимере ВДФ необходимо удлинять и растягивать полимерную струю для формирования ориентированных молекул, а также заряжать путем воздействия сильного электрического поля для генерации дипольного момента (Laroche G. et al., 1995).

Метод электроспиннинга, используемый в лаборатории гибридных материалов НИ ТПУ, позволяет решить проблему, связанную с формированием β -фазы, поскольку сам метод основан на применении электрического поля с высоким значением напряженности. В ходе воздействия электрического поля на полимерный раствор и струю происходит процесс их насыщения одноименными зарядами, в результате чего точечные заряды внутри полимерной струи отталкиваются. Это, в свою очередь, индуцирует возникновение различных механических деформаций струи, таких как растяжение. Электроспиннинг является наиболее распространенным и отработанным методом создания

нетканых материалов, который позволяет формировать полимерные волокна в относительно узком диапазоне значений диаметров и достигать однородной морфологии и структуры полимеров (Yang J. et al., 2010, Tutak W. et al., 2013). Метод электроспиннинга позволяет получить нетканые материалы с относительно высокими значениями механической прочности, способные имитировать топологию живых тканей организма. Поэтому он используется для формирования ранозаживляющих мембран и матриксов для тканевой инженерии (Koombhongse S. et al., 2001).

Как было указано выше, материалы из сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом (ВДФ-ТеФЭ) обладают пьезоэлектрическими свойствами, химической стойкостью и относительно высокими значениями механической прочности. Использование сополимеров из винилиденфторида с тетрафторэтиленом для формирования нетканых матриксов позволяет совместить преимущества двух полиэфиров: высокую термическую, химическую стойкость тетрафторэтилена и механическую прочность вместе с пьезоэлектрическими свойствами винилиденфторида (Bolbasov E.N. et al., 2015).

В ходе сканирующей электронной микроскопии было установлено, что ВДФ-ТеФЭ мембраны обладают волокнистой структурой, которая характеризуется хаотично переплетёнными между собой волокнами. По гистограммам распределения диаметров волокон было определено, что диаметры приблизительно 80 процентов волокон для всех образцов лежат в диапазоне от 0,4 до 1,2 мкм. Процентное соотношение волокон, диаметры которых составляют более 1,2 мкм, составляет примерно 20 процентов (Bolbasov E.N. et al., 2016).

Для исследования механических свойств полимерных мембран ВДФ-ТеФЭ были проведены испытания на растяжение. Предел прочности не зависел линейно от времени модифицирования, что говорило о возможном отсутствии связи между этими параметрами (Bolbasov E.N. et al., 2016).

Однако, такой сополимер не обладает противомикробными свойствами, что не исключает риск контаминации раневой поверхности микроорганизмами при его использовании. Более того, полимеры из тетрафторэтилена, винилиденфторида и другие фторсодержащие полимеры обладают низкой степенью адгезии к клеткам (Grill A. et al., 1994, Noh I. et al., 1998). Для увеличения степени адгезии фторопласты модифицируют различными плазменными методами: модифицирование высокочастотной аргоновой плазмой, плазменно-иммерсионная ионная имплантация и модифицирование в плазме тлеющего разряда (Dusa M.D. et al., 1998, Вах D. V. et al., 2014, Chen M. et al., 2003).

Было показано, что модифицирование различных полимерных материалов в плазме магнетронного разряда, при распылении медной мишени, позволяет придавать их поверхностям антибактериальные и бактериостатические свойства (Badaraev A.D. et al., 2017, Chen Y.H. et al., 2015). Также при концентрации ионов меди до 0,1 ммоль/л в жидких растворах улучшается пролиферация мезенхимальных стволовых клеток (Burghardt I. et al., 2015).

Таким образом, полимерный материал из сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом обладает хорошей биосовместимостью, химической стабильностью и термостойкостью и широко применяется в различных сферах медицины. Модифицирование в плазме магнетронного разряда позволяет придать полимерам противомикробные свойства и улучшить адгезию клеток регенерации. Полученный в результате такого модифицирования ВДФ-ТеФЭ сополимер может быть использован в качестве материала для изготовления противоспаечных мембран, раневых повязок, имплантов и других биомедицинских изделий.

1.5. Использование ионов меди в медицине и возможность модификации ими раневых покрытий

Медь с древних времен использовалась как антибактериальное средство (Родимин Е.М. и др., 2003). В настоящее время ее значение не уменьшилось - ее препараты обладают антисептическими и вяжущими свойствами. По данным Федорова Ю.И. медь оказывает выраженное супрессивное действие на рост клеток *E.Coli*, превосходя по своей эффективности серебро (Федоров Ю.И. и др., 1983). Согласно исследованию А.А. Рахметовой, в ходе которого определялись антимикробные свойства наночастиц меди в зависимости от их дисперсности и фазового состава, они обладают большей антибактериальной активностью по отношению к грамположительным *St. albus*, чем к грамотрицательным *E.Coli*. Таким образом, наночастицы меди оказывают бактерицидное действие в концентрации от 1 до 10 мкг/мл, бактериостатическое при 0,5 мкг/мл, при концентрации 0,1 мкг/мл антимикробное действие не проявляется. В зависимости от дисперсности и фазового состава также меняются антимикробные свойства наночастиц меди - максимальная эффективность проявляется при содержании кристаллической меди равному $84,0 \pm 4,2$ % и содержании оксида меди CuO $16,0 \pm 1,6$ % и толщиной оксидной пленки 6 нм (Рахметова А.А. и др., 2011).

По данным Е.В.Герасько наночастицы меди, иммобилизованные на матрице из гидроксиметилцеллюлозы имеют выраженную антибактериальную активность по отношению к *St.Aureus*. Доказаны эффективные антимикробные свойства наночастиц меди к антибиотикорезистентным штаммам золотистого стафилококка (Бабушкина И.В., 2016). Таким образом, наночастицы меди можно использовать для купирования гнойно-воспалительных процессов, вызванных *St.Aureus*.

Нанопорошок меди концентрацией 10 мкг/мл вызывает резкое сокращение количества микробных клеток *Pseudomonas aeruginosa* (Добрейкин Е.А. и др., 2014).

Предположительно, механизм антибактериального действия меди в микробных клетках связан с ее аккумуляцией внутри клетки и специфическим

взаимодействием с полисахаридами клеточной стенки, в результате чего происходит выраженная потеря ионов калия внутриклеточными белками, а также с активацией образования активных форм кислорода (Mandal O. et al., 2006).

Мази, в состав которых входят наночастицы меди, оказывают ранозаживляющее действие. Так, площадь раневой поверхности значительно сокращается при использовании мази с концентрацией меди 0,002 % и содержанием кристаллической меди $96,0 \pm 4,5$ % по сравнению с препаратом «Солкосерил» (Рахметова А.А. и др., 2016). При этом токсичность наночастиц меди в 7,5 раз меньше чем сульфата меди. Также при введении наночастиц меди в организм происходит активация антиоксидантных ферментов (Ткаченко Т.В. и др., 2017).

По данным Maqusoood Ahamed, наночастицы оксида меди показали свою антимикробную активность по отношению к *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, and *Staphylococcus aureus* (Maqusoood A. et al., 2014).

Суспензии на основе наночастиц меди концентрацией 0,01 мкг/мл способствует регенерации раневой поверхности. Так, при ее использовании максимальная скорость заживления экспериментальной раны зафиксирована на 5-е сутки исследования и составила 112 мм/сутки, что существенно превышает аналогичные показатели в группе без лечения (35 мм/сутки). Максимальное сокращение площади экспериментальной раны зафиксировано на 7-10 сутки и составило 27%. При гистологическом исследовании на 21-е сутки полностью восстанавливается эпидермальный и дермальный слой, их толщина приближается к показателям, зафиксированным в группе контроля ($26,8 \pm 4,5$ мм и $93,1 \pm 6,1$ мм соответственно), когда в группе без лечения эти показатели достоверно выше ($45,9 \pm 3,8$ и $125,9 \pm 5,3$ соответственно). Также применение наночастиц меди снижает выраженность воспалительного ответа, показатели

лейкоцитарной формулы достигают нормальных значений, когда при отсутствии лечения наблюдается увеличение сегментоядерных и палочкоядерных лейкоцитов в крови. Данные результаты объясняются как прямым воздействием наночастиц меди на регенерацию раневого дефекта, так и ее антимикробными свойствами, которые способствуют защите раны от вторичного инфицирования (Бабушкина И.В. и др., 2016).

Наночастицы оксида меди являются менее токсичными, чем наночастицы оксида серебра, которые в концентрации 2,5 мг/л и размером 32 нм имеют сродство к клеткам крови и способны активировать их аэробное дыхание и синтез цинкпротопорфирина (Андрусишина И.Н. и др., 2011).

Исходя из вышеизложенного можно сделать вывод, что медь является эффективным противомикробным агентом, способным индуцировать регенерацию поврежденных тканей. Следовательно, ее использование в качестве модификатора перевязочных средств является перспективным с точки зрения оптимизации течения раневого процесса.

При плазменной обработке мембран происходит распыление медной мишени на поверхность полимерных волокон в виде пленки. При взаимодействии с атмосферным кислородом медь окисляется и образует оксидную пленку. При модифицировании полимерных мембран в плазме магнетронного разряда концентрация кислорода в них увеличивается в среднем в 1,2 раза. Это, возможно, связано с окислением приповерхностных слоев полимерной мембраны (Kolská Z. et al., 2012). Присутствие кислорода на немодифицированной мембране может быть связано с наличием загрязнений, оставшихся после испарения растворителя (Tverdokhlebov S.I. et al., 2015).

Процентная концентрация меди увеличивается с увеличением времени модифицирования, что указывает на процесс насыщения поверхности ВДФ-ТеФЭ мембран атомами меди. При увеличении времени модифицирования увеличивается также и процентное соотношение меди к кислороду. Это позволяет предположить, что оксидная пленка, формируемая непосредственно

после извлечения образцов из вакуумной камеры, препятствует дальнейшему проникновению кислорода в приповерхностные слои волокон, содержащих медь что исключает процессы формирования более толстой оксидной пленки (Борисова Н.В. и др., 2006).

При исследовании на сканирующем электронном микроскопе было установлено, что процесс модифицирования достоверно не влияет на диаметры волокон, следовательно, отсутствуют изменения в пределах прочности и, как следствие, в манипуляционных свойствах материала (Baji A. et al., 2010, Yao C. et al., 2008, Huang C. et al., 2006).

Таким образом, медь, являясь мощным антимикробным и противовоспалительным агентом, может использоваться для модификации раневых покрытий для улучшения процесса ранозаживления.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика экспериментального исследования

Работа выполнена на базе ФГБОУ ВО СибГМУ Министерства здравоохранения Российской Федерации и одобрена локальным этическим комитетом (протокол №5223/1 от 27.03.2018).

Разработанные полимерные мембраны были исследованы на цитотоксичность с использованием фибробластов клеточной линии 3T3L1 в лаборатории биополимеров и биотехнологий Томского государственного университета. После воздействия элюатов из полимерных мембран в течение 120 часов на фибробласты, жизнеспособность клеток находилась в диапазоне 95-101%. Все изменения лежали в пределах статистических отклонений и не являлись значимыми. Полимеры не содержали значимых количеств водорастворимых токсичных веществ и компонентов (Volbasov E.N. et al., 2016).

Антимикробная активность полимерных мембран, модифицированных медью, была исследована в лаборатории биополимеров и биотехнологий Томского государственного университета в соответствии с рекомендациями стандарта JIS L 1902 “Testing Antibacterial Activity and Efficacy on Textile Products” с использованием культуры *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. С учетом того что бактериостатические свойства были обнаружены только у образца, модифицированного в плазме в течение 120 секунд, для исследования были выбраны мембраны этого типа (Volbasov E.N. et al., 2016).

Эксперимент был выполнен на 60-ти крысах-самцах линии Вистар (Таблица 1). Животные были разделены на четыре группы: экспериментальную №1 (n=15), которым раневой дефект оставлялся открытым согласно стандартному ведению раневого процесса в полости рта, экспериментальную №2 (n=15), которым раневой дефект перекрывался полимерной матрицей на основе винилиденфторида с тетрафторэтиленом и экспериментальную №3 (n=15), которым раневой дефект перекрывался полимерной матрицей на основе

винилиденфторида с тетрафторэтиленом, модифицированной медью. Группа №4 контрольная (n=15) - крысы с интактной слизистой оболочкой. Животных содержали в стандартных условиях вивария, регламентированных требованиями Постановления Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29.08.2014 №51 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

Таблица 1. Распределение животных по экспериментальным группам

Группы животных		Контрольная группа	1-я экспериментальная группа	2-я экспериментальная группа	3-я экспериментальная группа
Сроки выведения из эксперимента (сутки)	3-и	5	5	5	5
	7-е	5	5	5	5
	12-е	5	5	5	5
Итого		60 животных			

С целью моделирования раневого дефекта слизистой оболочки полости рта животные были введены в состояние наркоза в ходе внутривенной инъекции препаратом "Золетил". В течении оперативного вмешательства крысам после антисептической обработки операционного поля 2% раствором хлоргексидина был иссечен лоскут слизистой оболочки в области щеки размером 7*4 мм. После остановки крови гемостатической губкой область раневого дефекта повторно была обработана 2% раствором хлоргексидина. Далее животным экспериментальных групп №2 и №3 по краям раны атравматичной иглой простыми узловыми швами фиксировалась полимерная мембрана (Рис.1).

Выведение животных из эксперимента производилось на 3-и, 7-е и 12-е сутки исследования путем введения в состояние гипоксии в CO₂-камере. После повторно иссекалась слизистая оболочка щеки на месте раневого дефекта с захватом тканей с периферии (отступ 0,5 см).



Рис.1. Оперативное вмешательство. Иссечение участка слизистой оболочки полости рта. Перекрытие раневого дефекта полимерной пьезоэлектрической мембраной без медного напыления при помощи узловых швов.

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с директивой Европейского Парламента №2010/63EU от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей».

2.2. Методы исследования

Макроскопическое исследование

К изучаемым критериям применялись одно/двух/трехуровневые ступени оценки качественных показателей. Так, наличие асимметрии лица оценивалось по следующей шкале: выраженная асимметрия - ++, слабо выраженная асимметрия - +, отсутствие асимметрии - -. Наличие рыхлого желтоватого налета: налет покрывал полностью раневой дефект - ++, налет покрывал раневой дефект частично - +, налет не покрывал раневой дефект - -. Неприятный запах из полости рта животных: его наличие - +, его отсутствие - -. Кровоточивость при снятии налета с поверхности раны: ее наличие - +, ее отсутствие - -. Гиперемия слизистой оболочки вокруг раневого дефекта: выраженная гиперемия - ++, легкая гиперемия - +, отсутствие гиперемии - -. Степень отека окружающих

тканей: выраженный отек - ++, невыраженный отек +, отсутствие отека -. Кроме того, фиксировались размеры раневого дефекта.

Гистологические методы

Приготовление гистологических препаратов осуществляли по общепринятой методике. Просматривали препараты на световом микроскопе Karl Zeuss Observer D1 (Германия) с использованием камеры для световой микроскопии Zeiss AxioCam ICc5 (Германия). Для этого окрашивали парафиновые препараты гематоксилином-эозином и по методу Ван Гизона пиррофуксином и гематоксилином, полутонкие толуидиловым синим по стандартным методикам.

Иммуногистохимическое исследование

Для иммуногистохимического окрашивания использовались кроличьи поликлональные антитела VEGF, CD-34, S-100, которые наносились на ранее подготовленные гистологические срезы. Докрашивание ядер производилось гематоксилином.

Система подсчета включала в себя характеристику интенсивности иммуногистохимической окраски исследуемых клеток, оцениваемую по 4 - бальной шкале: 0 - нет окрашивания, 1 - слабое окрашивание, 2 - умеренное окрашивание, 3 - сильное, 4 - очень сильное окрашивание.

Формула подсчета:

Histochemical scores = $\sum P(i) \times i$, где i - интенсивность окрашивания, выраженная в баллах от 0-4, $P(i)$ - процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью.

Электронная микроскопия

Полутонкие и ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB-5, BROMMA (Швеция) из материала, подготовленного по стандартной методике и окрашенного уранилацетатом и цитратом свинца. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм окрашивали толуидиловым синим и просматривали в световом микроскопе Karl Zeuss Observer D1 (Германия), ультратонкие срезы толщиной 0,1 мкм

контрастировали уранил ацетатом и цитратом свинца и изучали с помощью электронного микроскопа JEOL JEM -1400 CX (Япония).

Морфометрический анализ

В основе морфометрического анализа лежали классические методы стереометрии (Автандилов Г.Г., 1990). На срезах толщиной 4-5 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином и по методу Ван Гизона пиррофуксином и гематоксилином, подсчитывали показатели удельной площади (%) рыхлой волокнистой соединительной ткани, плотной волокнистой соединительной ткани, грануляционной ткани, лимфогистиоцитарной инфильтрации, удельной площади и относительной плотности (на 1 мм² среза), среднего диаметра венул, артериол, капилляров, индекса перикапиллярной диффузии (площадь ткани, которую кровоснабжает один капилляр) как соотношение среднего диаметра капилляров к их удельной площади, индекса Керногана (показатель пропускной способности микроциркуляторного русла) как соотношение толщины сосудистой стенки артериол к радиусу их просвета, толщины эпителиального пласта и его слоев. На полутонких срезах толщиной 1 мкм, окрашенных толуидиновым синим, подсчитывали относительную плотность в 1 мм² среза нейтрофилов, макрофагов, фибробластов, эозинофилов, плазмоцитов, лимфоцитов и тучных клеток. На ультратонких срезах толщиной 0,1 мкм, контрастированных уранил ацетатом и цитратом свинца, изучали ультраструктуру клеток лимфогистиоцитарной инфильтрации, грануляционной ткани, эпителия, нервно-трофического аппарата. При работе с изображениями использовалась программа обработки графических изображений Axio Vision, CarlZeiss (Германия) и Image, версия 1.52u (США).

Статистический анализ

Статистическую обработку проводили в программе Statistica 10.0, IBM (США). Проверку статистических гипотез на характер распределения признака проводили при помощи критерия Колмогорова-Смирнова. При обработке полученных результатов использовали методы описательной и

непараметрической статистики. Исследуемые параметры описывали как медиану и квартили, $M (Q1;Q3)$. При сравнении независимых выборок использовали критерий Краскала-Уоллиса с медианным тестом, для парных сравнений использовали критерий Вилкоксона. Для корреляционного анализа использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Эксперимент, забор материала, приготовление препаратов, микрофотографирование, морфометрический анализ изображений и статистическая обработка полученных данных проводились лично автором.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Макроскопические изменения слизистой оболочки щеки в ходе регенерации раневого дефекта при использовании полимерной пьезоэлектрической мембраны и без нее

Анализ макроскопического состояния раневого дефекта на разных этапах его заживления позволил оценить характер и интенсивность процесса регенерации в динамике, а также конечный результат в зависимости от методики лечения.

Результаты оценки макроскопической картины раневых дефектов на 3-и, 7-е и 12-е сутки приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Макроскопическая характеристика раневого дефекта в зависимости от методики лечения на 3-и, 7-е и 12-е сутки исследования

	3-и сутки			7-е сутки			12-е сутки		
	1-я группа	2-я группа	3-я группа	1-я группа	2-я группа	3-я группа	1-я группа	2-я группа	3-я группа
Размер дефекта (мм ²)	21.3±2.3	17.8±3.1	16.2±2.2	8.2±2.1	4.8±2.1	4.8±2.1	Рубец 4.5±0.3 мм	Рубец 1.5±0.2 мм	Рубец 1.4±0.2 мм
Асимметрия	++	+	+	+	-	-	-	-	-
Налет	++	+	+	+	-	-	-	-	-
Неприятный запах	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Кровоточивость	+	-	-	+/-	-	-	-	-	-
Отек окружающих тканей	++	+	+	+	+/-	+/-	-	-	-
Гиперемия окружающих тканей	++	+	+	+	-	-	-	-	-

Примечание: выраженная асимметрия - ++, слабо выраженная асимметрия - +, отсутствие асимметрии - -. Покрытие налетом всей поверхности - ++, частичное покрытие налетом - +, отсутствие налета - -. Неприятный запах из полости рта - +, отсутствие запаха - -. Кровоточивость при снятии налета - +, отсутствие налета - -. Гиперемия слизистой оболочки вокруг раневого дефекта: выраженная гиперемия - ++, легкая гиперемия - +, отсутствие гиперемии - -. Степень отека окружающих тканей: выраженный отек - ++, невыраженный отек +, отсутствие отека -.

На 3-и сутки исследования в 1-ой экспериментальной группе макроскопически визуализировался раневой дефект размером 21,3±2,3мм². При визуальном осмотре наблюдалась асимметрия лица с наличием отека щечной

области со стороны раневого дефекта. Поверхность раны была покрыта рыхлым желтоватым налетом. При обработке раны ватным тампоном, смоченным 0,05%-ным раствором хлоргексидина, наблюдалась кровоточивость и оголение раневой поверхности. Имелся неприятный запах из полости рта. Слизистая оболочка, окружающая раневой дефект была гиперемирована, отечна (Рис.2).



Рис.2. Раневой дефект в области щеки крысы с гиперемированной слизистой оболочкой по периферии и фибринозным налетом в центре. 1-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования.

У крыс 2-ой и 3-ей экспериментальной групп асимметрия лица была не выражена, отек щечной области не визуализировался. При снятии мембраны с раны наблюдался дефект размером $17,8 \pm 3,1 \text{ мм}^2$ у животных 2-ой группы и $16,2 \pm 2,2 \text{ мм}^2$ у животных 3-ей группы. В обеих группах фибринозный налет имелся по центру раны, по периферии наблюдалась гладкая глянцевая ярко-розовая ткань. Налет легко отделялся от поверхности раны при ее обработке ватным тампоном, смоченным 0,05%-ным раствором хлоргексидина, кровоточивость отсутствовала. Неприятный запах из полости рта отсутствовал. Гиперемия и отечность были выражены в меньшей степени, чем в 1-ой группе (Рис.3).



Рис.3. Раневой дефект в области щеки крысы с фибринозным налетом в центре. Макроскопическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 2-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования.

На 7-е сутки исследования у животных 1-ой группы асимметрия лица и отек щечной области на стороне оперативного вмешательства отсутствовали. В полости рта определялся раневой дефект размером $8,2 \pm 2,1 \text{ мм}^2$, по его центру имелся рыхлый фибринозный налет, легко снимающийся при обработке раны ватным тампоном, смоченным 0,05%-ным раствором хлоргексидина, кровоточивость из раны была незначительная. По краю регенерирующей поверхности наблюдалась шероховатая матовая розовая ткань, резко ограниченная от нормальной слизистой оболочки, которая, в свою очередь, была слегка гиперемирована и отечна по краям дефекта. Наблюдалось уменьшение объема мягких тканей в области раны, что являлось следствием рубцовой деформации (Рис.4).



Рис.4. Раневой дефект в области щеки крысы с гиперемированной слизистой оболочкой по периферии и фибринозным налетом в центре. 1-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования.

У животных 2-ой и 3-ей групп асимметрия лица отсутствовала, рана под мембраной была чистая, без налета. Размер раневого дефекта во 2-ой и 3-ей группах достоверно не отличался ($p > 0,05$) и был $4,8 \pm 2,1 \text{ мм}^2$. Слизистая оболочка вокруг раневого дефекта была бледно-розовая, не отечная. Регенерация происходила с достаточным восстановлением объема мягких тканей (Рис.5).



Рис.5. Раневой дефект в области щеки крысы с фибринозным налетом в центре. Макроскопическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей

экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования.

На 12-е сутки исследования во всех экспериментальных группах отсутствовала асимметрия лица, на месте раневого дефекта наблюдался рубец длиной $4,5 \pm 0,3$ мм для 1-ой группы и $1,5 \pm 0,2$ мм и $1,4 \pm 0,2$ мм для 2-ой и 3-ей групп соответственно. Слизистая оболочка вокруг рубца бледно-розовая, не отечная. В 1-ой группе отмечалось снижение объема мягких тканей на месте раневого дефекта, во 2-ой и 3-ей группах регенерация происходила с восстановлением мягких тканей в полном объеме (Рис.6, Рис.7).



Рис.6. Рубец на месте раневого дефекта слизистой оболочки щеки крысы. Снижение объема мягких тканей. 1-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования.



Рис.7. Регенерировавшая слизистая оболочка щеки крысы на месте раневого дефекта. Незначительная рубцовая деформация, отсутствие снижения объема мягких тканей. Макроскопическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования.

Таким образом, на основании анализа макроскопической картины, в ходе заживления раневого дефекта было установлено, что использование полимерной пьезоэлектрической мембраны, особенно модифицированной медью, способствовало более быстрому заживлению раневого дефекта. Данные изменения фиксировались в ходе визуального осмотра раневой поверхности на разных этапах заживления и выражались в быстром сокращении площади раневого дефекта и образованием рубца в 3 раза достоверно ($p < 0.05$) меньше, чем в группе без покрытия, при снижении степени гиперемии и отека окружающих тканей.

3.2. Морфологические изменения слизистой оболочки полости рта на месте раневого дефекта в ходе его регенерации при использовании полимерной пьезоэлектрической мембраны и без нее

3.2.1. Морфологические изменения эпителиального пласта в зависимости от методики ведения раневого дефекта на разных этапах его заживления

Процесс реэпителизации являлся неотъемлемой частью регенерации раны, обеспечивающий изоляцию тканей слизистой оболочки на месте дефекта от внешних раздражителей. На основании анализа изменений морфометрических показателей и ультраструктуры эпителия на 3-и, 7-е и 12-е сутки исследования можно было сделать выводы об интенсивности этого процесса.

В Таблице 3 представлена сводная информация, характеризующая восстановление эпителиального пласта в 1-ой, 2-ой и 3-ей экспериментальных группах, а также аналогичные показатели интактной слизистой оболочки (Таблица 3).

Таблица 3. Показатели изменения эпителиального пласта в ходе реэпителизации раневого дефекта в зависимости от методики лечения на 3-и, 7-е и 12-е сутки исследования М (Q1:Q3), мкм

	Контроль	3-и сутки			7-е сутки			12-е сутки		
		1-я группа	2-я группа	3-я группа	1-я группа	2-я группа	3-я группа	1-я группа	2-я группа	3-я группа
Толщина эпителиального пласта (мкм)	203,9 (200,2;204,4)	-	16,3 (15,7;17,2)*	20,3 (19,1;22,1)*	44,5 (43,2;6,1)*	67,7 (66,6;70,1)*#	87,8 (85,7;89,5)*#	107,3 (106,2;69,8)*	166,5 (165,2;168,2)#	184,6 (183,4;1856)#
Количество слоев	33,0 (32,0;35,0)	-	3,0 (2,0;4,0)*	4,0 (3,0;6,0)*	7,0 (6,0;8,0)*	13,0 (12,0;14,0)*#	16,0 (15,0;16,0)*#	12,0 (10,0;13,0)*	26,0 (23,0;27,0)#	29,0 (27,0;30,0)#
Толщина базального слоя (мкм)	9,2 (8,8;9,6)	-	6,2 (5,1;7,3)*	7,3 (7,1;7,5)*	6,7 (6,5;7,0)*	9,1 (8,9;9,5)*#	9,2 (8,8;9,6)*#	9,1 (8,8;9,5)	9,4 (8,9;9,6)	9,4 (8,9;9,9)
Толщина шиповатого слоя (мкм)	174,4 (172,1;176,35)	-	10,1 (9,8;11,6)*	13,0 (12,4;13,7)*	26,7 (25,9;27,7)*	45,1 (43,7;46,1)*#	65,5 (63,3;67,7)*#	84,8 (83,8;86,6)*	130,0 (128,8;132,2)#	147,7 (145,9;148,7)#
Толщина на поверхности	19,8 (16,4;22,5)	-	-	-	11,1 (9,0;12,5)*	13,8 (11,0;16,6)*	12,7 (10,1;16,2)*	13,3 (11,3;16,0)*	27,1 (24,9;29,1)*#	27,4 (25,6;29,7)*#

Толщина (мкм)										
Толщина на роговом слое (мкм)	1,4 (1,2;1,9) *#	-	-	-	15,6 (15,2; 16,2)*	6,45 (5,8;6,7) *#	5,7 (5,5;6,5) *#	8,3 (7,7;8,7)	1,6 (1,3;1,8) *#	1,5 (1,2;1,8) *#
Акантоз	-	-	-	-	+	+	+	++	-	-
Акантолиз	-	-	+	+	++	+	+	+	-	-

Примечание: выраженный акантоз-++, слабовыраженный акантоз- +, отсутствие акантоза - -. выраженный акантолиз-++, слабовыраженный акантолиз- +, отсутствие акантолиза - -.
*- наличие достоверных отличий с контрольной группой ($p < 0,05$)
#- наличие достоверных отличий с 1-ой группой ($p < 0,05$)

На 3-и сутки исследования в 1-ой экспериментальной группе по периферии раневого дефекта наблюдалось уплощение клеток базального и шиповатого слоев краевого эпителия. Типичный рельеф собственной пластинки в виде сосочков был выражен незначительно (Рис.8).

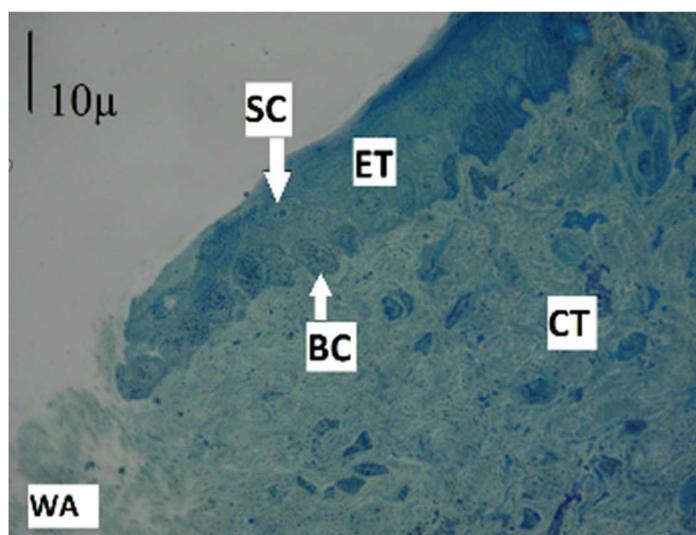


Рис.8. Краевой эпителий на периферии раны, миграция клеток базального слоя эпителия к центру раневого дефекта. 1-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. Окраска: толуидиновый синий. Увеличение: 1000.

ET – эпителий, CT – соединительная ткань, WA – область раневого дефекта, BC – базальные клетки, SC – клетки шиповатого слоя.

Во 2-ой и 3-ей экспериментальных группах клетки эпителия, располагающиеся в 3-4 слоя, полностью закрывали раневой дефект. Наблюдались акантолитические пузыри и явление паракератоза, который характерен для слизистой оболочки полости рта крысы (Рис. 9).

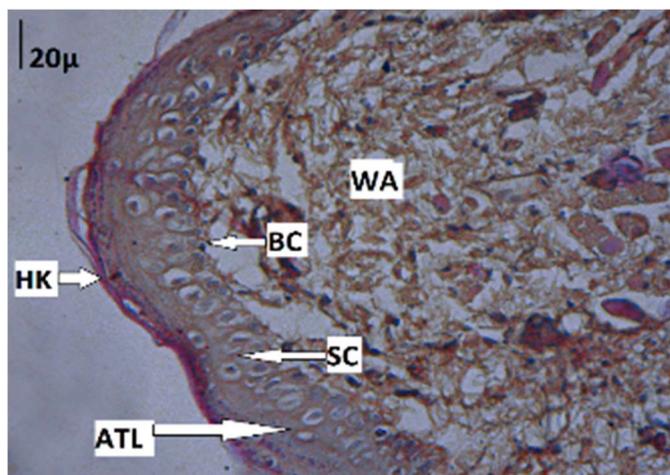


Рис.9. Новообразованный тонкий эпителиальный пласт в области раневого дефекта. Патологические изменения в виде акантолиза. Гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 2-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение: 400.

WA – область раневого дефекта, BC – базальные клетки, SC – клетки шиповатого слоя, HK – роговой слой, ATL - акантолиз.

На ультраструктурном уровне во 2-ой и 3-ей группах базальные клетки были вытянуты в ширину, апикально-базальная полярность не определялась, имелись признаки высокой пролиферативной активности, наблюдались клетки в процессе митоза. Клетки шиповатого слоя также имели полигональную уплощенную форму. Межклеточные контакты в виде десмосом были немногочисленными. Наблюдалось расширение межклеточных пространств, в которых визуализировался клеточный детрит, что обуславливало наличие патологических изменений в виде акантолиза (Рис.10, Рис.11).

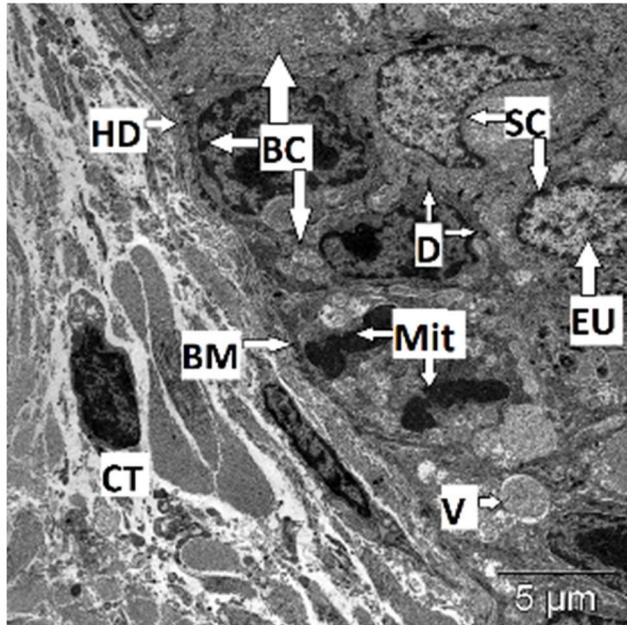


Рис.10. Клетки базального слоя с признаками высокой пролиферативной активностью и фигурами митоза. 2-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. Увеличение: 5000

CT-соединительная ткань, BM – базальная мембрана, BC – базальные клетки, SC – шпидоватые клетки, D – десмосомы, HD – полудесмосомы, V – расширение межклеточного пространства, EU – эухроматин, Mit – митоз.

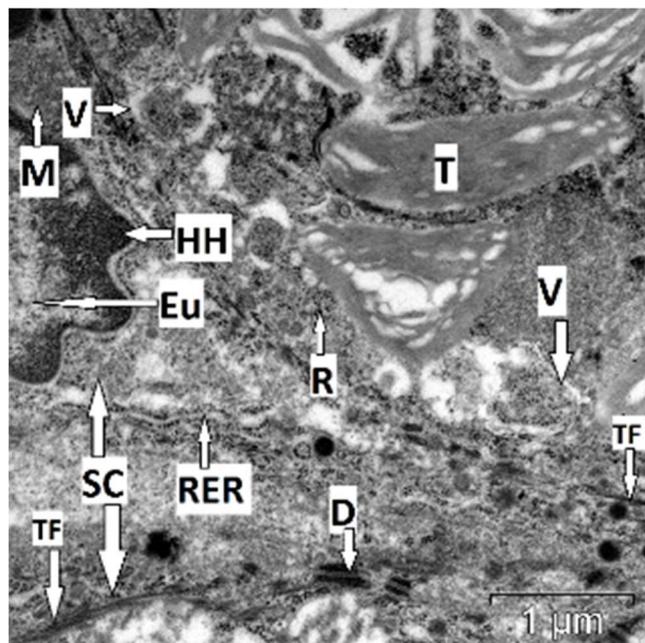


Рис.11. Клетки шиповатого слоя неправильной полигональной формы. Расширение и отек межклеточного пространства, наличие клеточного детрита между клетками. 3-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. Увеличение: 20000.

SC – шиповатые клетки, D – десмосомы, V – расширение межклеточного пространства, EU – эухроматин, HH – гетерохроматин, RER – гранулярный эндоплазматический ретикулум, R – полисомы, M – митохондрии, TF – тонофиламенты, T – клеточный детрит.

Толщина эпителиального пласта во 2-ой и 3-ей группах была в 12,5 и 10 раз достоверно меньше, чем в группе контроля ($p < 0,05$). При этом толщина базального слоя эпителия была в 1,5 и 1,3 раза, а шиповатого в 17,2 и 13,4 раза достоверно меньше, чем в группе контроля ($p < 0,05$) (Таблица 3).

Данные изменения базального слоя обуславливались тем, что закрытие раневого дефекта эпителием на этой стадии происходило, в основном, не за счет пролиферации клеток, а благодаря их уплощению и миграции от периферии к центру дефекта.

На 7-е сутки исследования во всех экспериментальных группах эпителий полностью перекрывал раневой дефект.

В 1-ой экспериментальной группе количество слоев эпителия было снижено, были выражены акантолитические процессы, утолщение шиповатого слоя, наличие рогового слоя.

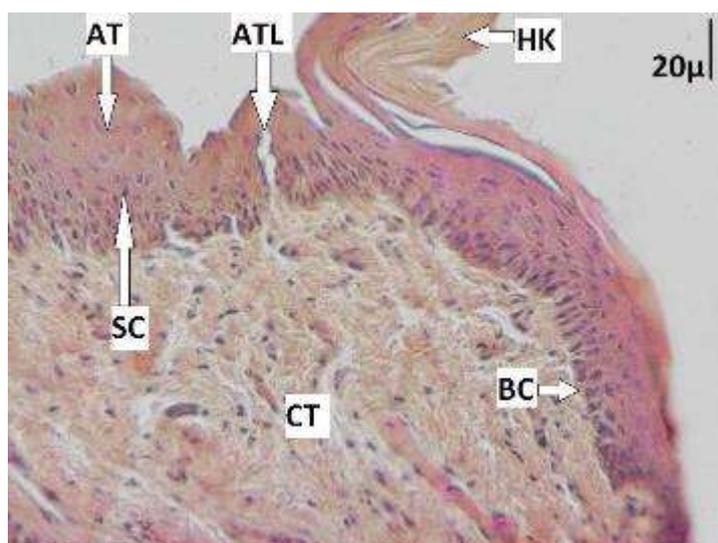
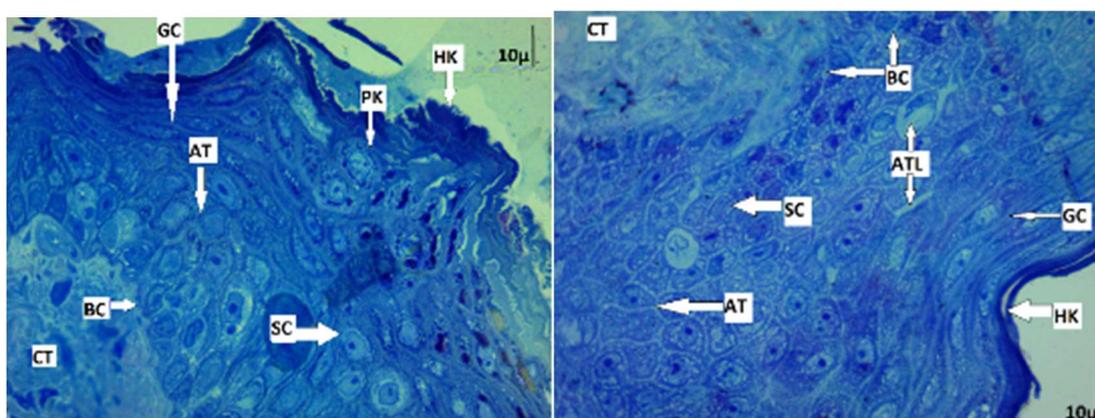


Рис.12. Патологические изменения эпителия в области регенерирующего раневого дефекта: неравномерная толщина эпителиального пласта, утолщение шиповатого слоя, акантолиз. 1-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение: 400.

CT – соединительная ткань, BC – базальные клетки, SC – клетки шиповатого слоя, HK – роговой слой, AT- акантоз, ATL - акантолиз.

Во 2-ой и 3-ей экспериментальных группах патологические изменения эпителия были выражены в меньшей степени, чем в группе без покрытия. Тем не менее, встречались участки с акантозоми и акантолизом (Рис.13а,б).



а

б

Рис.13. Слизистая оболочка полости рта крысы. Патологические изменения эпителия в области регенерирующего раневого дефекта: неравномерная толщина эпителиального пласта, утолщение шиповатого слоя, акантоз и акантолиз. Гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. а - 2-я экспериментальная группа, б - 3-я экспериментальная группа группы. 7-е сутки исследования. Окраска: толуидиновый синий. Увеличение: 1000.

СТ – соединительная ткань, ВС – базальные клетки, SC – клетки шиповатого слоя, GC – поверхностный слой эпителия, РК – клетки с пикнотизированными ядрами, НК – роговой слой, АТ- акантоз, АТL - акантолиз.

На ультраструктурном уровне акантолиз сопровождался наличием клеточного детрита в расширенных межклеточных пространствах и нарушением межклеточных контактов (Рис.14).

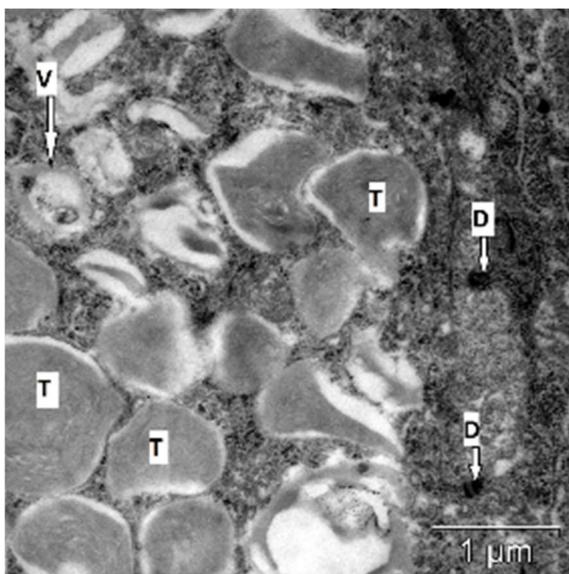
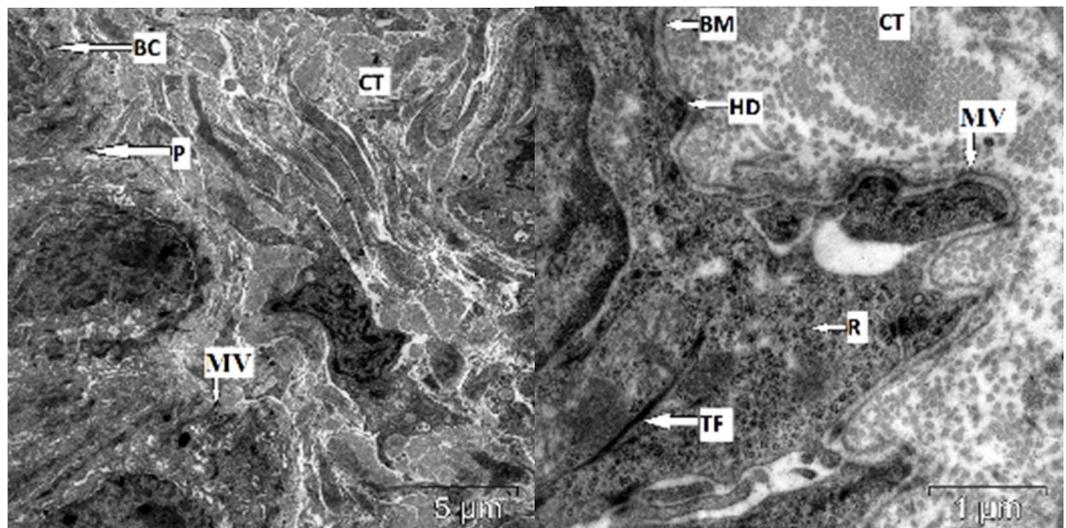


Рис.14. Шиповатый слой эпителия слизистой оболочки с клеточным детритом в расширенных межклеточных пространствах. 1-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. Увеличение: 20000.

D – десмосома, V – расширенное межклеточное пространство, T – клеточный детрит.

Также в ходе электронной микроскопии было обнаружено, что в группах с раневым покрытием базальные клетки постепенно приобретали типичную вытянутую в высоту форму и апикально-базальную полярность, восстанавливались контакты с базальной мембраной в виде полудесмосом. Многие клетки активно пролиферировали. Мембрана базальных клеток образовывала выросты, обращенные в сторону раны. Определялся типичный рельеф подлежащей к эпителию соединительной ткани в виде сосочков (Рис.15а,б).



а

б

Рис.15. Трансмиссионная электронная микроскопия. Слизистая оболочка полости рта крысы. Клетки базального слоя эпителия. Гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. Увеличение: а – 5000, б- 20000.

СТ – соединительная ткань, ВМ – базальная мембрана, ВС – базальные клетки, Р – сосочки соединительной ткани, MV- выросты плазмолеммы базальных клеток, R – полисомы, TF – тонофиламенты, HD – полудесмосомы.

Клетки шиповатого слоя имели признаки высокой синтетической активности – в ядре преобладал эухроматин, органеллы были представлены в достаточном количестве, хорошо визуализировались тонофиламенты. Межклеточные контакты в виде десмосом были представлены в большем количестве, чем на 3-и сутки исследования (Рис.16).

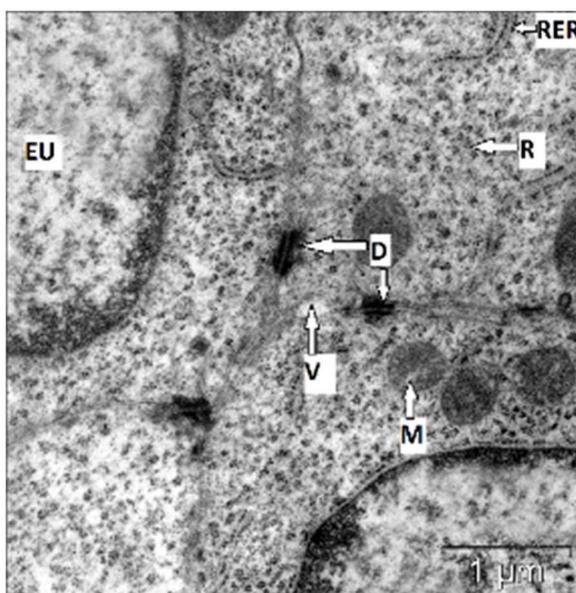


Рис.16. Клетки шиповатого слоя эпителия. Гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 2-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. Увеличение: 20000.

EU – эухроматин, RER – гранулярный эндоплазматический ретикулум, R – полисомы, D – десмосомы, M – митохондрии.

Во 2-ой и 3-ей группах был выражен поверхностный слой с большим количеством полисом и осмиофильных гранул кератогиалина (Рис.17).

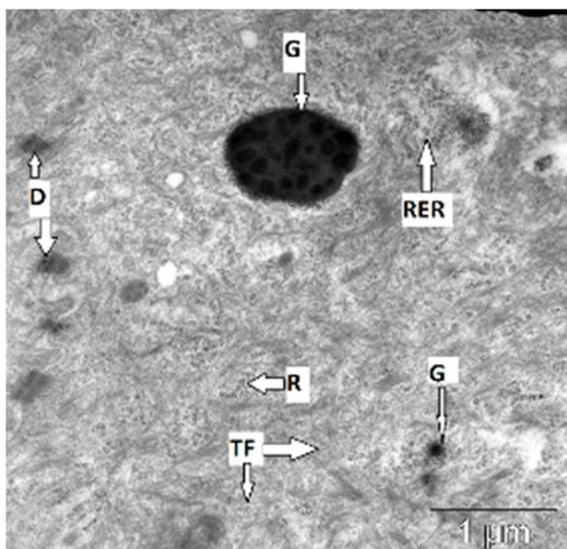


Рис.17. Клетки поверхностного слоя эпителия. 3-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. Увеличение: 20000.

G – гранула кератогиалина, RER – гранулярный эндоплазматический ретикулум, R – полисомы, D – десмосома, TF – тонофиламенты.

В ходе морфометрического исследования было установлено, что во всех экспериментальных группах по-прежнему имелись значимые изменения по сравнению с интактным эпителием.

В 1-ой экспериментальной группе толщина всех слоев эпителия была в 4,6 раз, а количество слоев в 4,7 раз достоверно меньше контрольных значений ($p < 0,05$). Толщина базального, шиповатого и поверхностного слоев также была в 1,4, 6,6 и 1,8 раз достоверно меньше, чем в группе контроля ($p < 0,05$). Толщина рогового слоя достигала 15,6 (15,2; 16,2) мкм (Таблица 3).

Во 2-ой и 3-ей экспериментальных группах толщина эпителиального пласта увеличивалась в 4,2 и 4,3 раза соответственно по сравнению с 3-ми сутками, что было в 3 и 2,3 раза достоверно меньше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$) (Таблица 3).

Количество слоев эпителия во 2-ой группе значимо увеличивалось в 2,3, а в 3-ей в 3,3 раза по сравнению с 3-ми сутками ($p < 0,05$). Толщина базального слоя в обеих группах достигала контрольных значений. Толщина шиповатого слоя во

2-ой и 3-ей группах была в 3,9 и 2,7 раз достоверно меньше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Толщина поверхностного слоя эпителия у животных всех экспериментальных групп достоверно не отличалась друг от друга и была в 1,8 раз значимо меньше, чем у крыс с интактной слизистой оболочкой. Толщина рогового слоя была в 2,4 и 2,7 раз для 2-ой и 3-ей групп достоверно меньше, чем в 1-ой группе ($p < 0,05$) (Таблица 3).

Таким образом, на 7-е сутки исследования во всех экспериментальных группах наблюдалось активное восстановление эпителиального пласта и повышение пролиферативной активности клеток. Несмотря на это, в нем отмечались патологические изменения клеток – акантоз и акантолиз, что особенно было выражено в группе без раневого покрытия.

На 12-е сутки исследования в 1-ой экспериментальной группе толщина эпителиального пласта по-прежнему отличалась от показателей контроля и была в 1,9 раз достоверно меньше ($p < 0,05$). Количество слоев эпителия при этом было в 2,75 раз достоверно меньше контрольных значений ($p < 0,05$) (Таблица 3).

Такое несоответствие между толщиной эпителия и количеством слоев наблюдалось из-за наличия явлений акантолиза, что на ультраструктурном уровне выражалось в наличии вакуолей в межклеточном пространстве, и акантоза в шиповатом слое за счет пролиферации клеток (Рис.18, Рис.19).

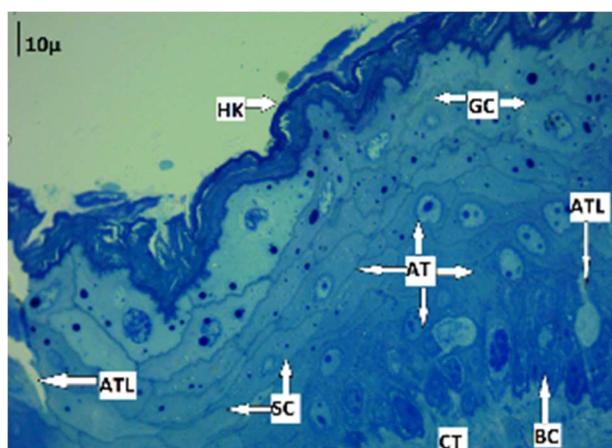


Рис.18. Эпителий в области регенерирующего раневого дефекта с наличием патологических изменений: утолщением шиповатого слоя,

акантолитическими пузырями. 1-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Окраска: толуидиновый синий. Увеличение: 1000.

ET – эпителий, *CT* – соединительная ткань, *BC* – базальные клетки, *SC* – клетки шиповатого слоя, *НК* – роговой слой, *AT* - акантоз, *ATL* - акантолиз.

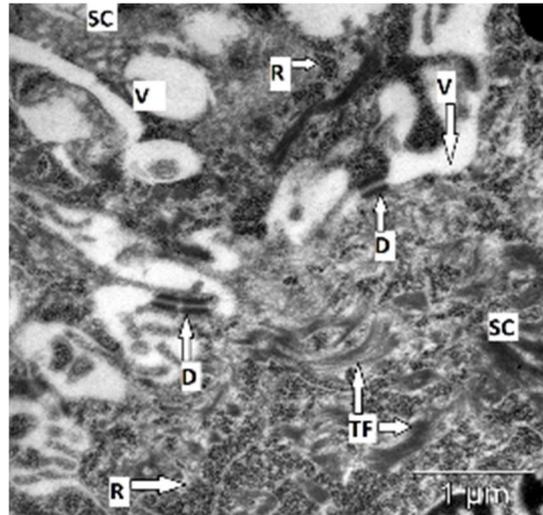


Рис.19. Шиповатый слой эпителия с вакуализацией цитоплазмы клеток и межклеточного пространства. 1-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Увеличение: 20000.

SC – шиповатые клетки, *R* – полисомы, *TF* – тонофиламенты, *D* – десмосомы, *V* – вакуоли.

Клетки базального слоя приобретали типичную кубическую форму, восстанавливали свою высоту до контрольных показателей ($p > 0,05$). На ультраструктурном уровне апикально-базальная полярность клеток по-прежнему не определялась, в цитоплазме визуализировались многочисленные вакуоли, межклеточное пространство было расширено. Плазмолемма образовывала выросты в сторону прилежащей соединительной ткани. Клеточные контакты в виде десмосом и полудесмосом были представлены в малом количестве (Рис.20а,б).

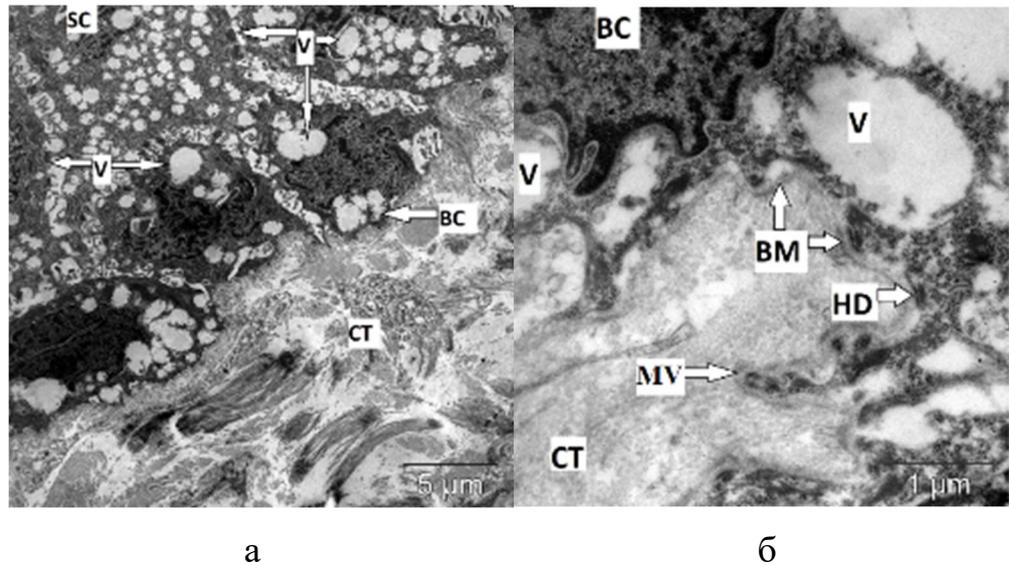


Рис.20. Базальный слой эпителия с клетками без апикально-базальной полярности, признаки вакуольной дистрофии и акантолитических изменений эпителиального пласта. 1-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Увеличение: а – 5000, б- 20000.

СТ-соединительная ткань, ВМ- базальная мембрана, ВС – базальные клетки, SC – шиповатые клетки, HD – полудесмосомы, V – вакуоли, MV - микроворсинки.

Толщина шиповатого слоя была в 3,9 раз меньше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Толщина клеток поверхностного слоя достоверно не увеличилась по сравнению с 7-ми сутками исследования ($p > 0,05$) и по-прежнему была в 1,4 раза достоверно меньше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$) (Таблица 3).

В клетках поверхностного слоя было повышено содержание полисом и осмиофильных гранул. Также в поверхностном слое обнаруживались клетки с визуализировались пикнотизированными ядрами, остатками органелл и кератин. На поверхности эпителиального пласта обнаруживались роговые чешуйки (Рис. 21а,б).

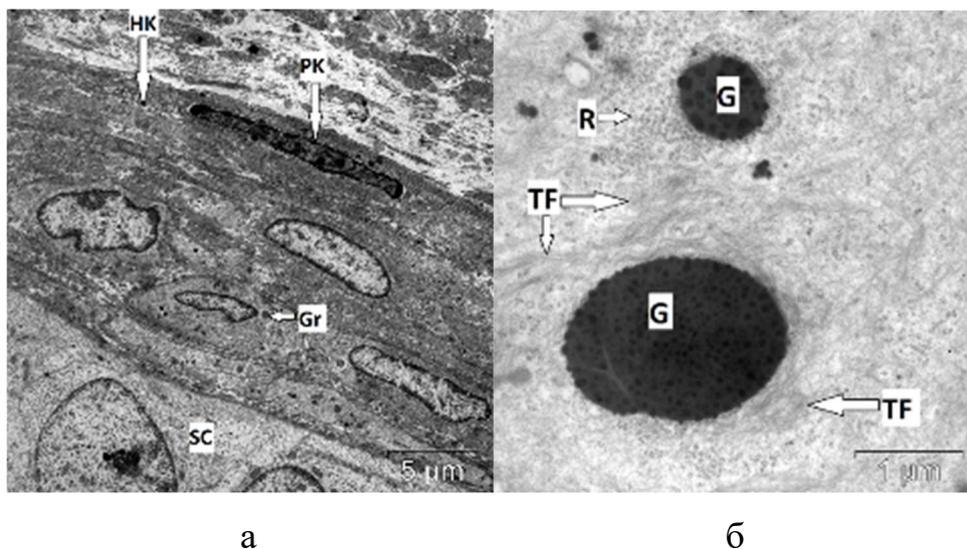


Рис.21. Клетки поверхностного слоя эпителия. 1-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Увеличение: а – 5000, б- 20000.

SC – клетки шиповатого слоя, *G* – гранула кератогиалина, *R* –полисомы, *TF* – тонофиламент, *PK* – клетки с пикнотизированными ядрами, *HK* – роговой слой.

Толщина рогового слоя клеток достоверно уменьшалась в 2 раза по сравнению с предыдущей контрольной точкой ($p < 0,05$) (Таблица 3).

В группах, где использовалось раневое покрытие, толщина и количество слоев эпителия достигали значений контроля. Толщина базального и шиповатого слоев также не имели значимых отличий от аналогичных показателей интактной слизистой оболочки ($p > 0,05$) (Таблица 3).

Клетки приобретали форму и ультраструктуру, свойственные многослойному плоскому неороговевающему эпителию - цитоплазма была светлой, в ней хорошо визуализировались органеллы. В ядрах по-прежнему преобладал эухроматин. Между клетками прослеживались четкие и многочисленные десмосомальные контакты, клеточный детрит и вакуоли отсутствовали. Базальная мембрана была четкая и непрерывная, она образовала полудесмосомные контакты с базальным слоем клеток эпителия. Подлежащая соединительная ткань вдавалась в эпителий, образуя выраженные сосочки,

содержащие сосуды микроциркуляторного русла. (Рис.22, Рис.23, Рис.24, Рис.25).

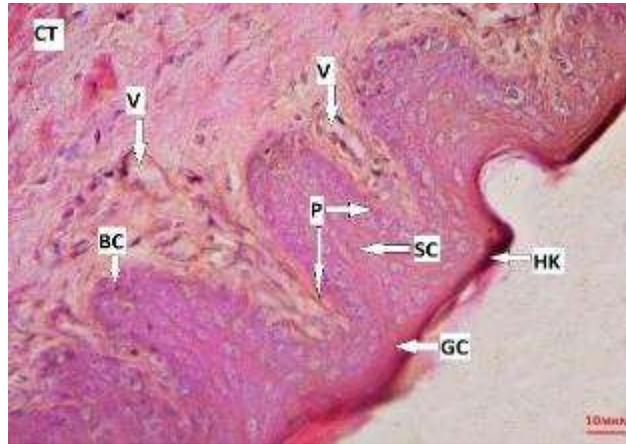


Рис.22. Гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 2-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение: 400.

CT – соединительная ткань, BC – базальные клетки, SC – клетки шиповатого слоя, GC – поверхностный слой, НК – роговой слой, P – сосочки, V – венула.

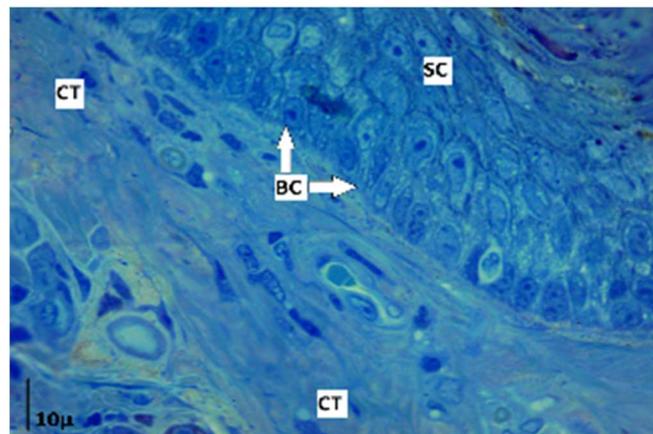


Рис.23. Эпителий в области регенерировавшего раневого дефекта. Одинаковые по высоте клетки базального слоя, плотно прилегающие друг к другу, отсутствие патологических изменений. 3-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Окраска: толуидиновый синий. Увеличение: 1000.

ET – эпителий, СТ – соединительная ткань, ВС – базальные клетки, SC – клетки шиповатого слоя,

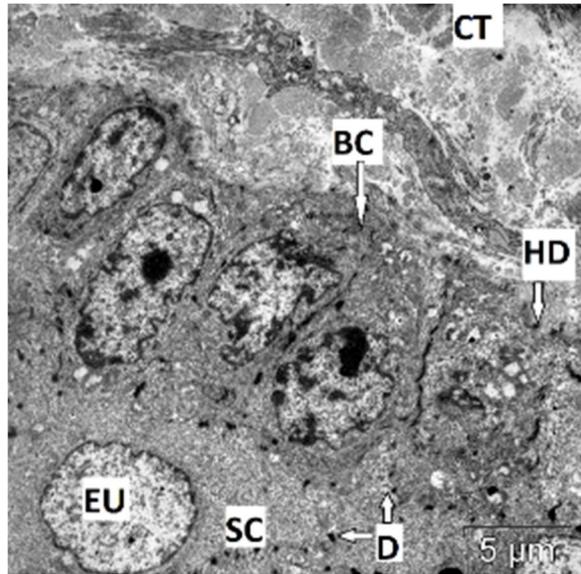


Рис.24. Клетки базального слоя эпителия правильной кубической формы с межклеточными контактами в виде десмосом. Гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 2-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Увеличение: 5000.

СТ – соединительная ткань, ВС – базальные клетки, SC – шиповатые клетки, HD – полудесмосомы, D – десмосомы, EU – эухроматин.

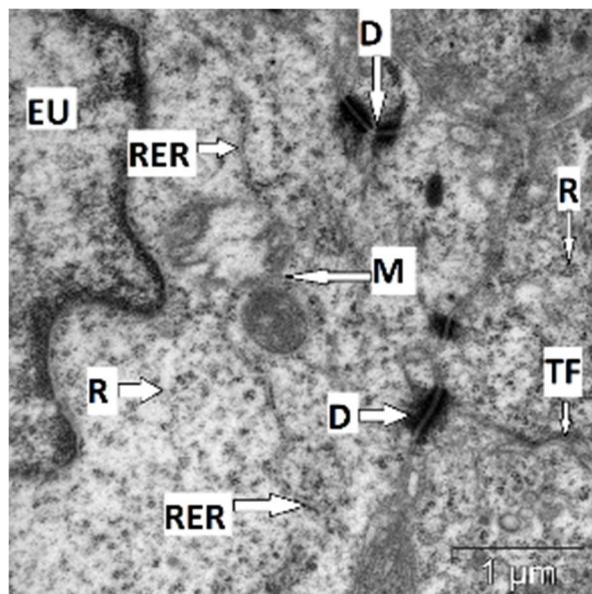


Рис.25. Клетки шиповатого слоя эпителия формы с межклеточными контактами в виде десмосом и хорошо выраженными органеллами. Гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Увеличение: 20000.

REER – гранулярный эндоплазматический ретикулум, R – полисомы, TF – тонофиламенты, M – митохондрии, EU – эухроматин, D – десмосомы.

Толщина поверхностного слоя эпителия между группами с покрытием не отличалась друг от друга, но была в 1,35 раза достоверно больше, чем в группе контроля ($p < 0,05$). Этот факт, вероятно, был связан с тем, что клетки вытягивались в высоту. Во 2-ой группе толщина рогового слоя была в 5,2 раз достоверно меньше, чем в группе без покрытия ($p < 0,05$) (Таблица 3).

Таким образом, защита раневого дефекта полимерной мембраной от повторной травматизации и микробной контаминации способствовала более быстрой эпителизации, нормализуя форму, размер и ультраструктуру клеток и восстанавливая межклеточные контакты. При этом снижался риск возникновения таких патологических процессов как акантоз и акантолиз.

3.2.2. Морфологические изменения в собственной пластинке слизистой оболочки полости рта в зависимости от методики ведения раневого дефекта на разных этапах его заживления

В ходе регенерации раневого дефекта происходит последовательный переход с одной стадии течения раневого процесса на другую. В основе этого перехода лежит смена клеточных популяций, а также постепенное формирование соединительнотканых волокон.

На 3-и сутки исследования во всех экспериментальных группах на поверхности раневого дефекта наблюдался некротический детрит, содержащий

обломки волокон соединительной ткани и деструктивно измененные клетки, а также палочковидные и шаровидные микроорганизмы (Рис 26а,б).

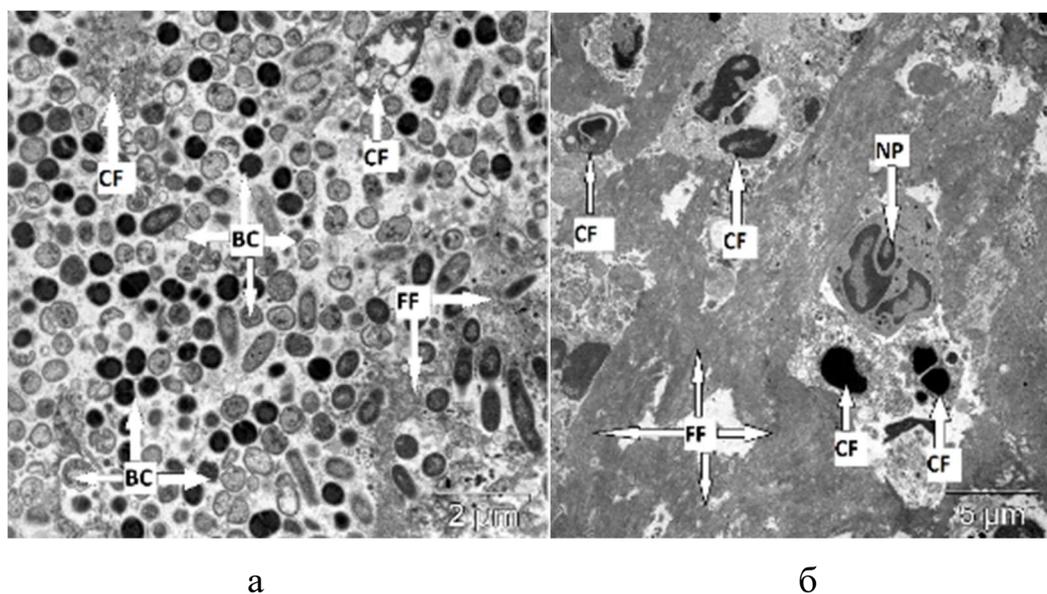


Рис.26. Раневая поверхность с некротическим детритом. 3-и сутки исследования. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. а – 1-я экспериментальная группа, увеличение: 10000. б – 2-я экспериментальная группа. Увеличение: 5000

FF – обломки соединительнотканых волокон, *CF* – деструктивно измененные клетки, *BC* – бактериальные клетки, *NP* – нейтрофилы.

Под ним определялась область регенерации, заполненная грануляционной тканью с многочисленными тонкостенными сосудами (Рис.27). Удельная площадь грануляционной ткани в группах с покрытием достоверно не отличалась друг от друга и была в 1,4 раз достоверно больше, чем в группе без него ($p < 0,05$) (Таблица 4).

Таблица 4. Удельная площадь грануляционной ткани, лимфогистиоцитарной инфильтрации, рыхлой волокнистой соединительной ткани, плотной волокнистой соединительной ткани в

области раневого дефекта в зависимости от методики лечения на 3-и, 7-е и 12-е сутки исследования М (Q1:Q3), %

	Удельная площадь грануляционной ткани, %	Удельная площадь клеточной инфильтрации, %	Удельная площадь рыхлой волокнистой соединительной ткани, %	Удельная площадь плотной волокнистой соединительной ткани, %
Контроль (n=5)	-	7.7 (5.2;9.5)	92.3 (87.2;95.4)	-
3-и сутки				
1-я группа (n=5)	43.4 (39.4;47.9)*	56.6 (50.3;60.9)*	-*	-
2-я группа (n=5)	58.7 (52.1;65.0)*#	41.3(34.9;47.8)*#	-*	-
3-я группа (n=5)	60.8 (58.5;62.6)*#	39.2 (37.3;41.4)*#	-*	-
7-е сутки				
1-я группа (n=5)	38.9 (35.8;41.8)*	52.8 (49.9;56.6)*	7.8 (6.3;9.1)*	-
2-я группа (n=5)	45.2 (41.6;47.9)*	28.2 (26.2;30.1)*#	26.6 (24.2;28.7)*#	-
3-я группа (n=5)	41.6 (40.5;43.5)*	23.3 (21.9;24.1)*#	35.1 (33.9;35.9)*#	-
12-е сутки				
1-я группа (n=5)	-	15.4 (11.4;18.7)*	60.4 (52.5;73.0)*	23.0 (14.3;27.8)*
2-я группа (n=5)	-	6.7 (5.7;8.8) #	83.6 (73.0;88.6)#	7.6 (3.8;16.4)%*#
3-я группа (n=5)	-	1.4 (1.2;1.9)*#	92.7(92.5;93.9)#	5.9 (5.5;6.3)*#

*-достоверные различия по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$).

#-достоверные различия по сравнению с группой, в которой не использовалось раневое покрытие ($p \leq 0,05$).

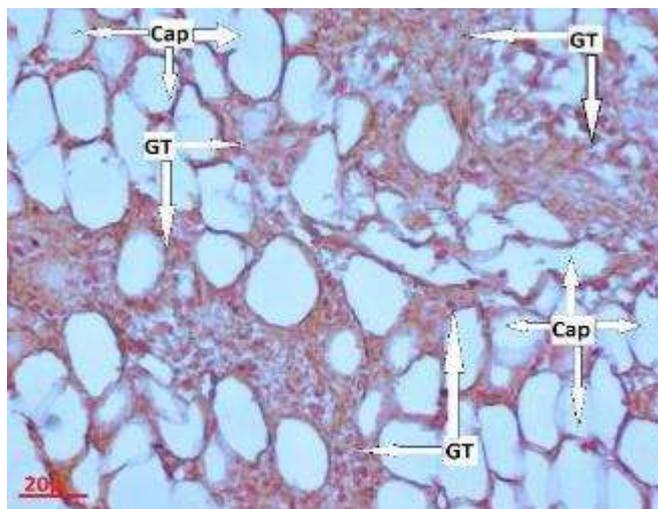


Рис.27. Новообразованные сосуды грануляционной ткани. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение: 400.

Сар – капилляр, GT – грануляционная ткань.

Здоровые ткани отделялись от раневого дефекта зоной обширной воспалительной клеточной инфильтрации, состоящей из нейтрофилов, макрофагов, плазмоцитов, лимфоцитов и эозинофилов (Рис.28, Рис.29). Удельная площадь клеточной инфильтрации во 2-ой и 3-ей группах не имела значимых отличий, но была в 1,4 раз достоверно меньше, чем в 1-ой группе ($p < 0,05$) (Таблица 5).

Таблица 5. Численная плотность клеточных элементов в области раневого дефекта слизистой оболочки полости рта в 1мм^2 среза в зависимости от методики лечения на 3-и, 7-е и 12-е сутки исследования М (Q1:Q3)

	Численная плотность нейтрофилов	Численная плотность макрофагов	Численная плотность фибробластов	Численная плотность тучных клеток	Численная плотность плазмоцитов	Численная плотность лимфоцитов	Численная плотность эозинофилов
Контроль	12,0 (10,0; 17,7)	163,0 (158,0;165,0)	380,0 (376,0;391,7)	45,00 (43,0;46,0)	176,0 (173,2;178,7)	12,0 (0;14,0)	10,0 (0;20,0)
3-и сутки							
1-я группа	2911,5* (2865,0;2956,0)	772,5* (750,2;788,0)	3782,0* (3721,0;3849,5)	12,0* (12,0;13,0)	197,0 (94,0;100,7)	161,0* (159,0;164,0)	75,0* (73,0;77,7)
2-я группа	1765,0*# (1745,7;1793,7)	1274,0*# (1251,7;1294,0)	4464,0* (4418,5;4505,5)	17,0* (16,0;19,0)	192,0 (89,0;94,0)	147,5* (144,0;149,7)	55,0* (52,0;56,0)
3-я группа	1355,5*# (1294,0;1366,5)	1750,0*# (1735,2;1785,5)	5378,5*# (5346,2;5465,7)	17,0* (16,0;20,0)	192,0 (88,0;94,0)	149,0* (145,0;152,7)	47,0* (45,0;50,0)
7-е сутки							
1-я группа	1148,0* (1128,5;1171,2)	1846,0* (1831,2;1869,0)	4530,5* (4472,5;4579,7)	127,0* (125,0;131,0)	73,5* (71,0,2;77,7)	323,0* (319,0;327,0)	71,0* (67,2;72,7)

2-я группа	855,5* (791,7;919,7)	1470,5* (1435,2;1488,7)	5436,0* (5372,7;5512,2)	224,5*# (220,2;321,0)	98,0*# (95,2;102,1)	548,0*# (544,5;563,0)	42,0*# (38,0;44,7)
3-я группа	581,0*# (569,7;585,7)	1128,0*# (1118,5;1145,7)	6136,0*# (6126,0;6145,0)	321,0*# (319,0;327,0)	127,0# (122,0;131,0)	629,0*# (627,2;635,0)	29,0*# (25,2;32,0)
12-е сутки							
1-я группа	457,0* (452,0;465,0)	971,0* (947,0;1138,2)	2746,5* (2639,0;2906,0)	130,0* (125,2;132,0)	100,0* (95,0;102,0)	226,0* (223,0;229,0)	18,0* (16,0;19,0)
2-я группа	99,5*# (95,0;102,0)	159,0# (157,2;163,7)	397,0# (392,2;400,7)	45,0# (43,2;46,0)	151,0# (145,2;155,0)	109,0*# (108,0;113,5)	10# (0;10,0)
3-я группа	12 # (12,0;13,0)	147,5# (143,0;149,7)	397,5# (395,0;402,0)	45,0# (43,0;46,0)	175,0# (173,0;177,0)	93,5*# (91,0;95,0)	10# (10,0;17,0)

*-достоверные различия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$)

#-достоверные различия по сравнению с 1-ой группой ($p < 0,05$)

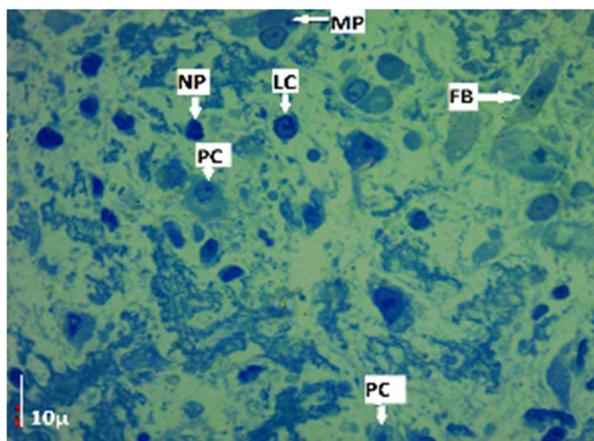


Рис.28. Клеточная инфильтрация в области раневого дефекта. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. 1-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. Окраска: толуидиновый синий. Увеличение: 1000.

PC – плазмоцит, LC – лимфоцит, FB – фибробласт, MP – макрофаг, NP – нейтрофил.

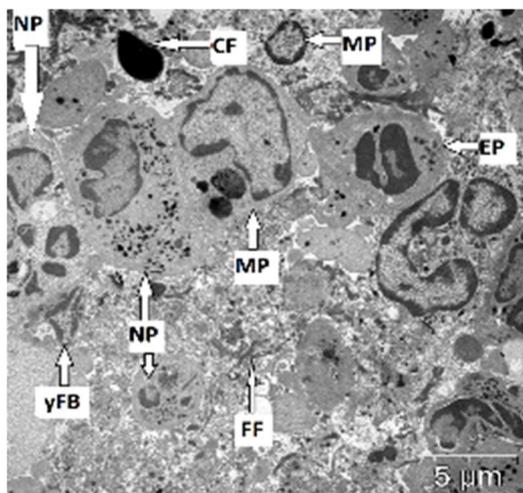


Рис.29. Клеточная инфильтрация в области раневого дефекта. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. 2-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. Увеличение: 5000.

yFB – молодой фибробласт, MP – макрофаг, NP – нейтрофил, EP – эозинофил, FF – фрагменты соединительнотканых волокон, CF – деструктивно измененные клетки.

На 3-и сутки исследования основная роль при воспалении принадлежала нейтрофилам, численная плотность которых значительно повышалась во всех экспериментальных группах, в то время как в интактной слизистой оболочке они практически не встречались. Их численная плотность в 1-ой экспериментальной группе в 1 мм^2 среза была в 1,65 и 2,15 раз достоверно больше, чем во 2-ой и 3-ей экспериментальных группах и в 242 раза достоверно больше, чем в группе контроля (Таблица 5).

В области раневого дефекта преобладали зрелые сегментоядерные нейтрофилы. Они располагались в окружении обломков волокон, деструктивно измененных клеток соединительной ткани и бактериальных клеток. Ультраструктура нейтрофилов свидетельствовала об их высокой фагоцитарной активности: в цитоплазме визуализировались множественные гранулы, глыбки гликогена, фагосомы и резидуальные тельца, мембрана клеток образовывала псевдоподии. При этом такие органеллы как комплекс Гольджи,

эндоплазматическая сеть, митохондрии были выражены слабо, почти не визуализировались (Рис.30а,б).

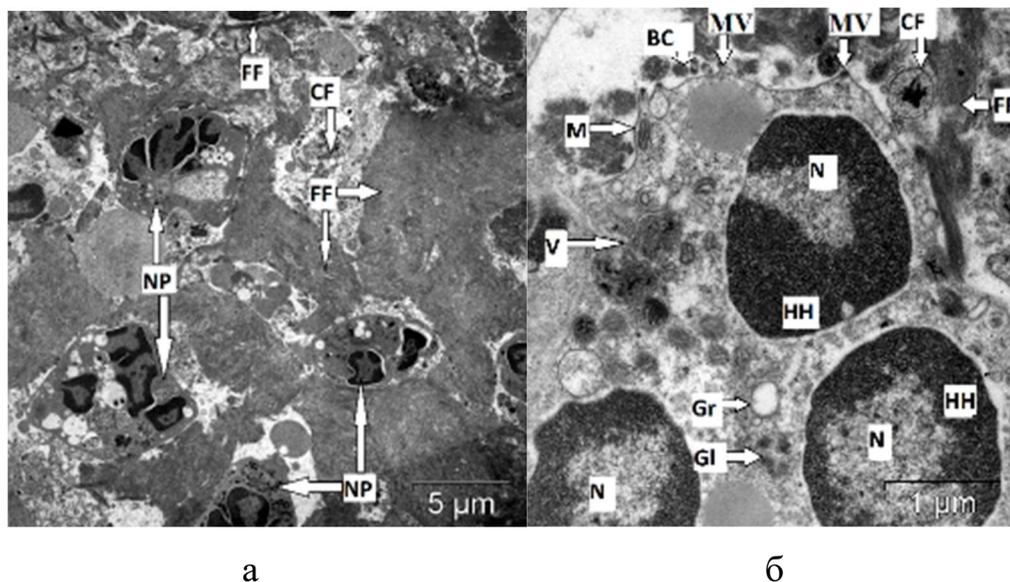


Рис.30. Нейтрофил в области раневого дефекта. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. 1-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. Увеличение: а – 5000, б – 20000.

NP – нейтрофил, *FF* – фрагменты соединительнотканых волокон, *CF* – деструктивно измененные клетки, *BC* – бактериальная клетка, *N* – ядро, *HH* – гетерохроматин, *M* – митохондрия, *V* – фаголизосомы, *Gr* – гранулы, *Gl* – гликоген, *MV* - выросты плазмолеммы.

Следующим этапом воспалительной стадии была смена нейтрофильной инфильтрации на макрофагальную, что было особенно выражено в группах с покрытием.

Так, численная плотность макрофагов в 1-ой группе в 1мм^2 среза была в 4,7 раз достоверно больше, чем в контрольной группе, и в 1,65 и 2,3 раза достоверно меньше, чем во 2-ой и 3-ей группах соответственно ($p < 0,05$) (Таблица 5).

При ультрамикроскопическом исследовании у макрофагов подобно нейтрофилам наблюдались признаки высокой фагоцитарной активности: цитолемма образовывала псевдоподии, в цитоплазме визуализировалось большое количество фаголизосом и резидуальных телец. Митохондрии имели четко структурированные крипты, а также обширная гранулярная эндоплазматическая сеть и комплекс Гольджи свидетельствовали о высоком уровне синтетических процессов, связанных с образованием биологически активных веществ, детерминирующих воспалительные и регенераторные процессы (Рис.31).

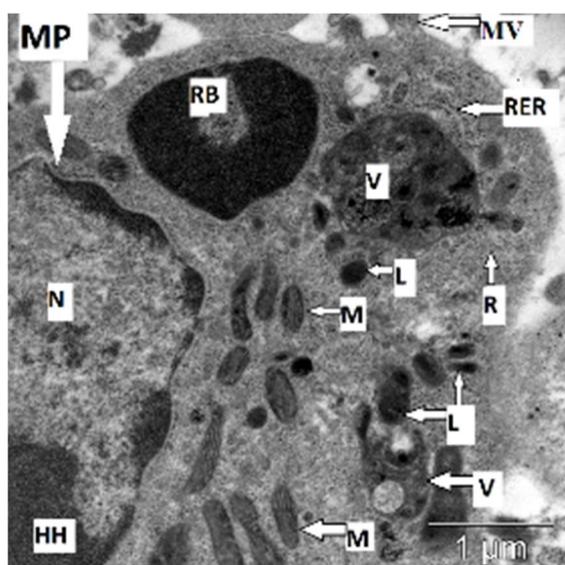


Рис.31. Макрофаг в области раневого дефекта. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. Увеличение: 20000

MP – макрофаг, N – ядро, HH – гетерохроматин, RER – гранулярный эндоплазматический ретикулум, R – полисомы, M – митохондрия, L – лизосома, V – фаголизосома, RB – резидуальное тельце, MV - выросты плазмолеммы.

Тучные клетки преимущественно располагались вблизи сосудов, по периферии которых наблюдался интерстициальный отек. Их численная плотность в 1мм^2 среза достоверно снижалась в 1-ой группе в 3,75 раз по

сравнению с интактной слизистой оболочкой, что, возможно, связано с их дегрануляцией. Это значение достоверно не отличалось от аналогичного показателя во 2-ой и 3-ей экспериментальных группах ($p>0,05$) (Таблица 5).

Численная плотность эозинофилов в 1мм^2 среза достоверно не отличалась между экспериментальными группами ($p>0,05$), и была в 7,5 раз достоверно больше, чем в группе контроля ($p<0,05$). Численная плотность плазмоцитов в 1мм^2 среза в экспериментальных группах значимо не отличалась от контрольных значений ($p>0,05$). Численная плотность лимфоцитов в 1мм^2 среза в 1-ой экспериментальной группе достоверно не отличалась от других экспериментальных групп ($p>0,05$), но была в 13,4 раз значимо больше, чем в группе контроля ($p<0,05$) (Таблица 5).

В группах с покрытием наблюдались отдельные пучки соединительнотканых волокон (Рис.32, Рис.33), среди которых встречались молодые фибробласты. Их численная плотность в 1мм^2 среза повышалась - в 3-ей она была в 1,4 раза значимо больше, чем в 1-ой и 2-ой группах, и в 14 раз достоверно больше, чем в контрольной группе ($p<0,05$) (Таблица 5).

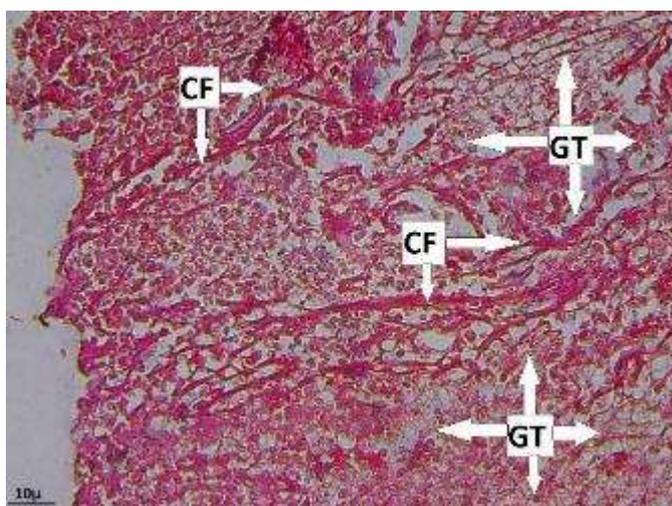


Рис.32. Новообразованные соединительнотканые волокна в области раневого дефекта. Гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. Окраска: по Ван Гизону. Увеличение: 400.

CF – соединительнотканьные волокна, GT – грануляционная ткань.

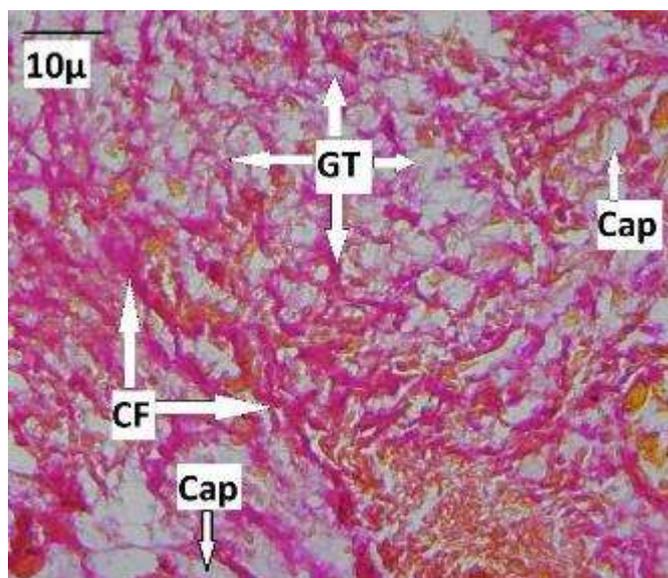


Рис.33. Новообразованные соединительнотканьные волокна в области раневого дефекта. Гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 2-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. Увеличение: 900. Окраска: по Ван Гизону.

CF – соединительнотканьные волокна, GT – грануляционная ткань, Cap – капилляры.

Во всех группах преобладали юные фибробласты небольшого размера с умеренно развитыми органеллами синтеза – гранулярной эндоплазматической сетью, комплексом Гольджи, преимущественно везикулярной формы, и свободными полисомами. В ядре определялись обширные зоны с гетерохроматином, сконцентрированным, в основном, по периферии, в центральной части ядра был распределен деконденсированный хроматин. Площадь ядра и цитоплазмы была визуалью одинаковой, визуализировались крупные митохондрии с четко структурированными кристами. Возле плазматической мембраны наблюдались везикулы, возможно содержащие молекулы проколлагена. По периферии от фибробластов наблюдались признаки экстрацеллюлярного отека (Рис.34).

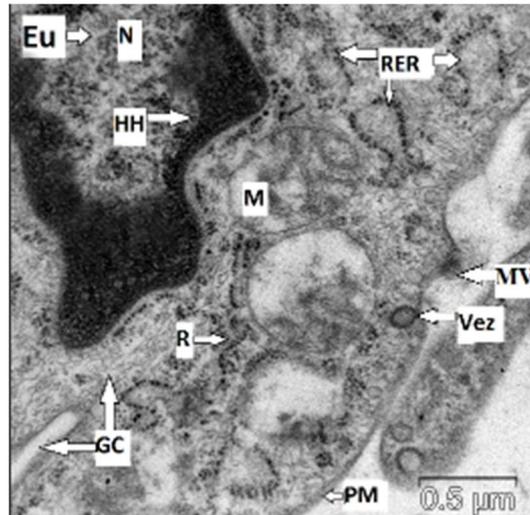


Рис.34. Юный фибробласт в области раневого дефекта. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. Увеличение: 25000.

PM – плазматическая мембрана, N – ядро, HH – гетерохроматин, Eu – эухроматин, RER – гранулярный эндоплазматический ретикулум, R – полисомы, M – митохондрия, GC – Комплекс Гольджи, MV - выросты плазмолеммы, Vez – везикулы.

На 7-е сутки исследования в собственной пластинке слизистой оболочки щеки на месте раневого дефекта во всех экспериментальных группах определялись участки со сформированной рыхлой волокнистой соединительной тканью (Рис.35). Ее удельная площадь была максимальной в 3-ей экспериментальной группе, что значимо превышало аналогичные значения в 1-ой и 2-ой экспериментальных группах в 4,5 и 1,3 раза соответственно, но было в 2,6 раз достоверно меньше, чем в группе контроля ($p < 0,05$) (Таблица 4).

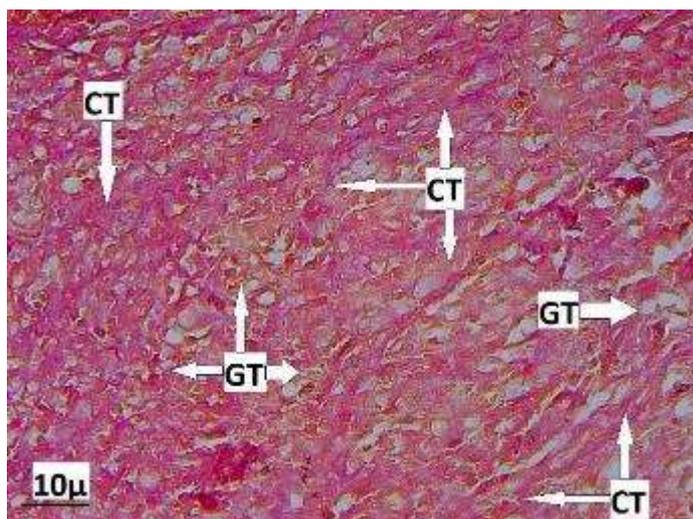


Рис.35. Рыхлая волокнистая соединительная ткань на месте раневого дефекта. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. 2-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. Увеличение: 400. Окраска: по Ван Гизону.

СТ – соединительная ткань, GT – грануляционная ткань.

Большую удельную площадь по-прежнему занимала грануляционная ткань (Рис.36), которая достоверно не отличалась во всех экспериментальных группах ($p > 0,05$), но достоверно снижалась в 1,3 раза для 2-ой группы и 1,5 раза для 3-ей группы по сравнению с 3-ми сутками исследования ($p < 0,05$). В 1-ой группе достоверных отличий по данному показателю по сравнению с 3-ми сутками исследования выявлено не было ($p > 0,05$) (Таблица 4).

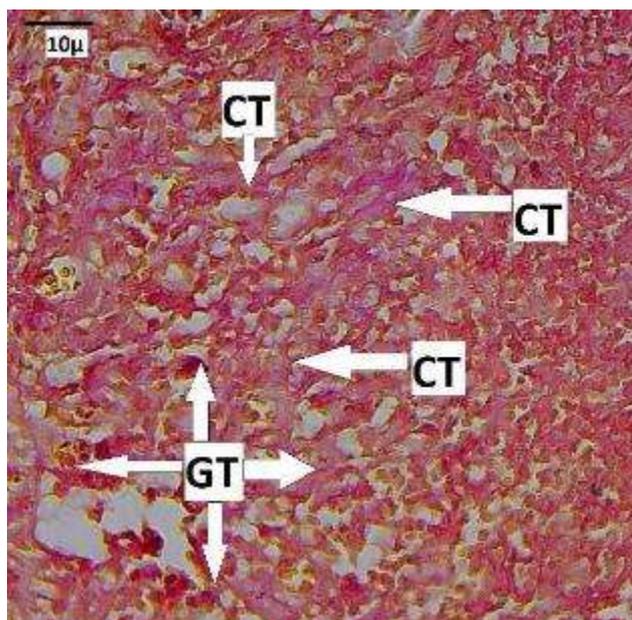


Рис.36. Грануляционная ткань и области с рыхлой волокнистой соединительной тканью на месте раневого дефекта. 1-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. Увеличение: 400. Окраска: по Ван Гизону.

CT – соединительная ткань, GT – грануляционная ткань

На 7-е сутки исследования пролиферация становилась доминирующим процессом. В группах, где для защиты раневого дефекта использовались полимерные мембраны, количество фибробластов увеличивалось по сравнению с группой с традиционной методикой лечения, где формированию рыхлой волокнистой соединительной ткани препятствовала постоянная травматизация слизистой оболочки. Их численная плотность достоверно увеличивалась по сравнению с 3-ми сутками исследования в 1,2 раза во всех экспериментальных группах ($p > 0,05$). В 1-ой группе она была в 12, во 2-ой в 14, в 3-ей в 16 раз достоверно больше, чем в группе контроля ($p > 0,05$). При этом этот показатель в 3-ей группе был в 1,35 раз достоверно больше ($p > 0,05$), а во 2-ой группе значимо не отличался от группы без покрытия ($p < 0,05$) (Таблица 5).

В группах с покрытием преобладали крупные дифференцированные фибробласты отростчатой формы с высокой синтетической активностью – эухроматин занимал практически всю площадь ядра, по центру

визуализировались 1-3 ядрышка. В цитоплазме определялись хорошо развитые гранулярная эндоплазматическая сеть, занимающая практически всю площадь цитоплазмы, полисомы и комплекс Гольджи от которого мигрировали везикулы, содержащие, по всей видимости, молекулы проколлагена. Плазматическая мембрана образовывала многочисленные выросты. В окружении клеток наблюдались пучки соединительнотканых волокон, расположенные в разных плоскостях (Рис.37). В группе без покрытия по-прежнему преобладали юные фибробласты, ультраструктура которых практически не изменилась по сравнению с 3-ми сутками.

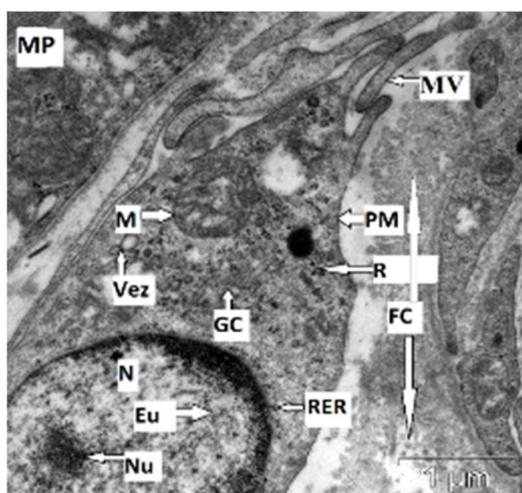


Рис.37. Дифференцированный фибробласт, окруженный соединительноткаными волокнами в области раневого дефекта. Гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. Увеличение: 20000.

MP – макрофаг, PM – плазматическая мембрана, N – ядро, Nu – ядрышко, Eu – эухроматин, RER – гранулярный эндоплазматический ретикулум, R – полисомы, M – митохондрия, GC – Комплекс Гольджи, MV - выросты плазмолеммы, Vez – везикулы, FC – соединительнотканые волокна.

Несмотря на доминирование репаративных процессов, в месте регенерации раневого дефекта по-прежнему визуализировались очаги клеточной инфильтрации, состоящей из нейтрофилов, макрофагов, плазмоцитов, лимфоцитов и эозинофилов (Рис.38). Удельная площадь клеточной инфильтрации во 2-ой и 3-ей группах значимо не отличалась друг от друга и уменьшалась в 1,7 раз по сравнению с 3-ми сутками исследования, что было в 2,3 раза достоверно меньше, чем в 1-ой группе ($p < 0,05$) (Таблица 5).

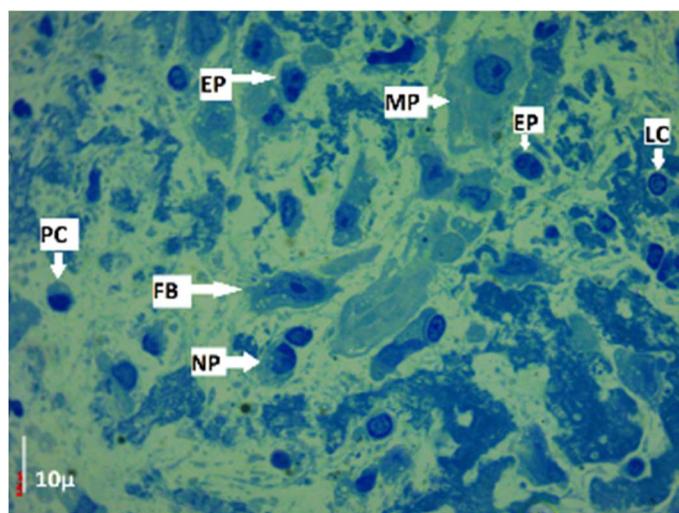


Рис.38. Клеточная инфильтрация в области раневого дефекта. 1-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. Окраска: толуидиновый синий. Увеличение: 1000.

PC – плазмоцит, LC – лимфоцит, FB – фибробласт, MP – макрофаг, NP – нейтрофил, EP - эозинофил

На 7-е сутки исследования менялось соотношение удельной плотности отдельных клеточных популяций по сравнению с 3-ми сутками в связи с переходом процесса регенерации раны на новый этап.

Ведущая роль в воспалительном процессе переходила макрофагам, которые стали доминирующей популяцией по сравнению с нейтрофилами. Они имели признаки высокой фагоцитарной активности – в цитоплазме визуализировалось большое количество фаголизосом, наблюдались

множественные псевдоподии (Рис.39). Их численная плотность в 1 мм² среза в 1-ой и 2-ой группах значимо не отличалась между собой и повышалась в 2,4 и 1,3 раза по сравнению с 3-ми сутками ($p < 0,05$), при этом был в 1,6 и 11,1 раз достоверно больше по сравнению с 3-ей и контрольной группами соответственно ($p < 0,05$) (Таблица 5).

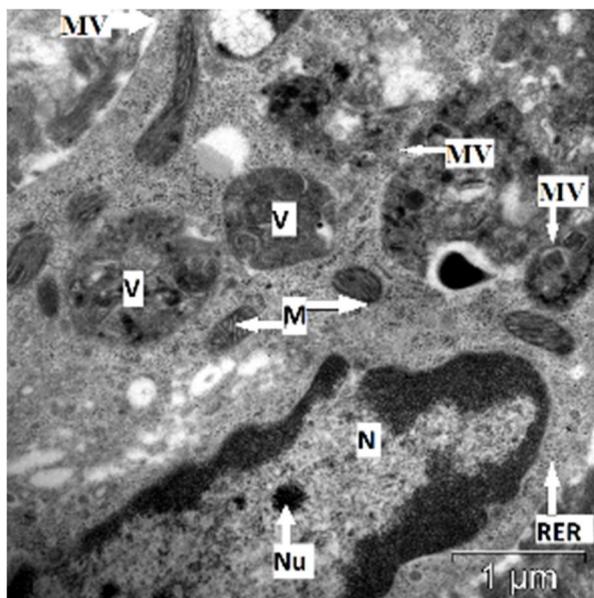


Рис.39. Макрофаг в области раневого дефекта. 2-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. Увеличение: 20000.

N – ядро, *Nu* – ядрышко, *RER* – гранулярный эндоплазматический ретикулум, *M* – митохондрия, *V* – фаголизосома, *MV* – выросты плазмолеммы.

Численная плотность нейтрофилов в 1 мм² среза достоверно снижалась в 2,3 для 1-ой и 3-ей групп и в 2 раза для 2-ой группы по сравнению с 3-ми сутками исследования ($p < 0,05$) (Таблица 5).

Также изменялась численная плотность плазмоцитов и лимфоцитов в 1 мм² среза. Данный показатель для первых достоверно снижался по сравнению с 3-ми сутками исследования во всех экспериментальных группах в 2,7, 1,9 и 1,5 раз соответственно ($p < 0,05$) и был в 2,4 для 1-ой группы и в 1,8 для 2-ой и 3-ей групп достоверно меньше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Численная плотность

лимфоцитов достоверно повышалась по сравнению с 3-ми сутками во всех экспериментальных группах в 2, 3,7 и 4,2 раза соответственно ($p < 0,05$), что было в 27 раз для 1-ой и в 52 раза для 2-ой и 3-ей групп достоверно больше, чем в группе контроля ($p < 0,05$) (Таблица 5).

Численная плотность в 1 мм^2 среза эозинофилов достоверно снижалась в 1,6 раз только в 3-ей экспериментальной группе по сравнению с 3-ми сутками исследования, что в 2,9 раз было значимо больше, чем в группе контроля ($p < 0,05$). В 1-ой и 2-ой экспериментальных группах достоверных различий по сравнению с 3-ми сутками исследования выявлено не было ($p > 0,05$) (Таблица 5).

Численная плотность в 1 мм^2 среза гранулированных тучных клеток достоверно увеличивалась во всех экспериментальных группах по сравнению с 3-ми сутками исследования в 10,6, 13,2 и 18,4 раз для 1-ой, 2-ой и 3-ей групп соответственно ($p < 0,05$) и была в 2,7, 5 и 7,1 раз достоверно больше, чем в группе контроля ($p < 0,05$) (Таблица 5).

Располагались тучные клетки преимущественно недалеко от сосудов. В клетках наблюдалось большое количество гранул разной электронной плотности, которые частично выделялись в окружающую ткань путем экзоцитоза. Из органелл в цитоплазме хорошо визуализировалась гранулярная эндоплазматическая сеть, митохондрии. Ядро было с умеренным количеством гетерохроматина (Рис.40, Рис.41).

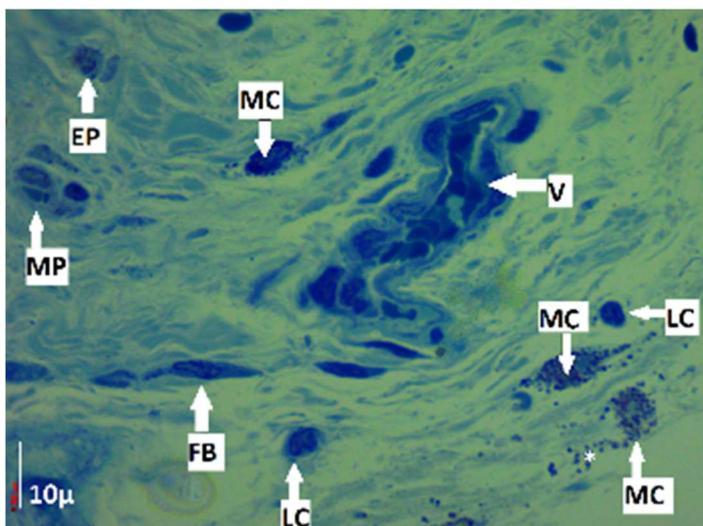


Рис.40. Дегрануляция тучных клеток. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. 2-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. Окраска: толуидиновый синий. Увеличение: 1000.

MC – тучная клетка, V – венула, PC – плазмоцит, LC – лимфоцит, FB – фибробласт, MP – макрофаг, EP – эозинофил.

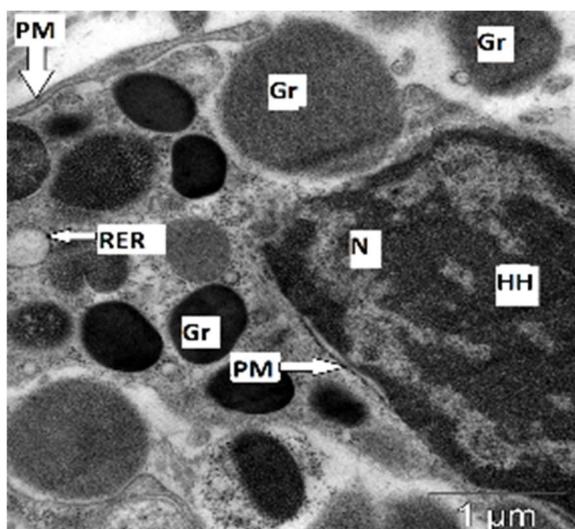


Рис.41. Дегрануляция тучной клетки. Гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 2-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. Увеличение: 20000

N – ядро, HH – гетерохроматин, RER – гранулярный эндоплазматический ретикулум, PM – плазматическая мембрана, Gr – гранула.

На 12-е сутки исследования во всех экспериментальных группах исчезала грануляционная ткань, вместо нее обнаруживалась молодая рыхлая волокнистая соединительная ткань (Рис.42). В группе без покрытия между соединительнотканными волокнами обнаруживались участки с внутритканевым отеком (Рис.43). Удельная площадь рыхлой волокнистой соединительной ткани достигала контрольных значений для групп с покрытием, что было в 1.5 раза значимо больше, чем в группе без него ($p < 0,05$) (Таблица 4).

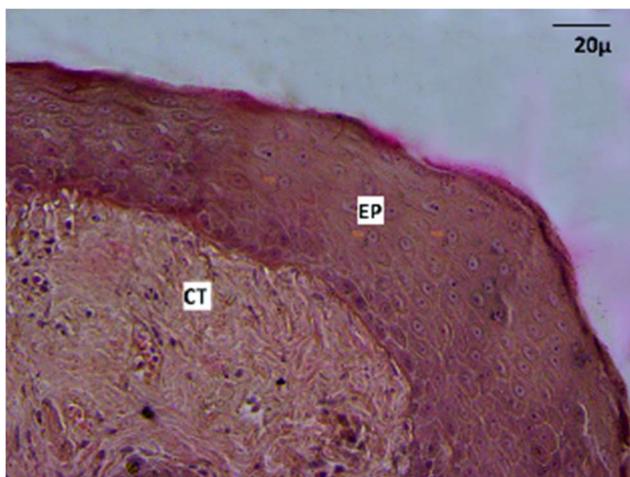


Рис.42. Восстановленная соединительная ткань на месте раневого дефекта. Гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Окраска: Гематоксилин и эозин. Увеличение: 400.

EP – эпителий, CT – рыхлая волокнистая соединительная ткань.

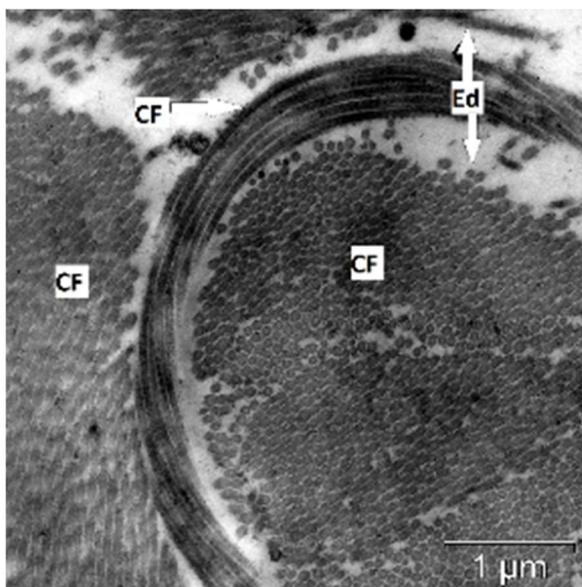


Рис.43. Отек между соединительнотканными волокнами в области раневого дефекта. 1-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Увеличение: 20000.

CF – соединительнотканные волокна, Ed- отек

Кроме того, встречались очаги с рубцовыми изменениями, основу которых составляла плотная волокнистая соединительная ткань (Рис.44, Рис.45). Ее максимальная удельная площадь была зафиксирована в группе, где не использовалось раневое покрытие. Этот показатель был в 1-ой экспериментальной группе в 3 и 3,9 раз достоверно больше, чем во 2-ой и 3-ей группах соответственно ($p < 0,05$) (Таблица 4).

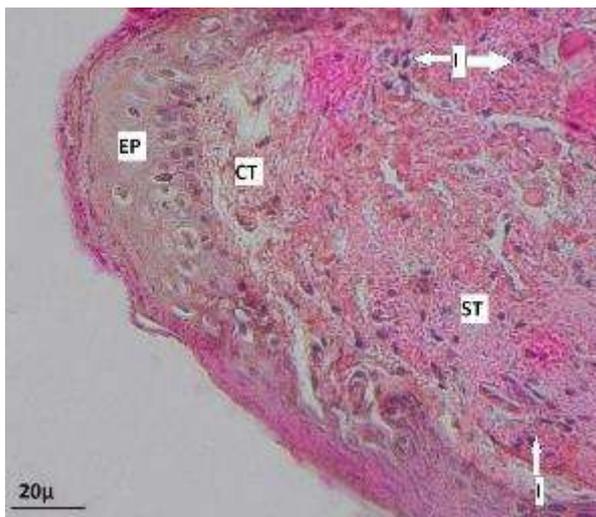


Рис.44. Рубцовые изменения на месте раневого дефекта. 1-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Окраска: Гематоксилин и эозин. Увеличение: 400

EP –эпителий, CT – рыхлая волокнистая соединительная ткань, ST – плотная волокнистая соединительная ткань, I – инфильтрация.

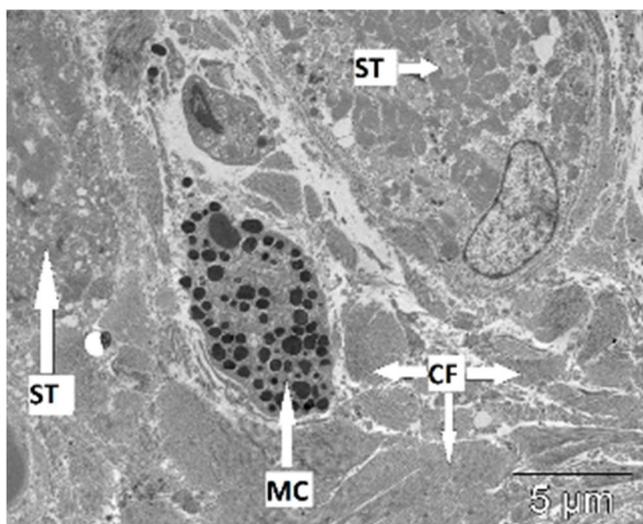


Рис.45. Плотная волокнистая соединительная ткань в области раневого дефекта. 1-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Увеличение: 20000.

CF – соединительнотканьные волокна, MC – тучная клетка, ST – плотная волокнистая соединительная ткань.

Также в группе без покрытия сохранялась воспалительная клеточная инфильтрация (Рис.46), в отличие от групп, в которых раневой дефект перекрывался полимерной мембраной, где ее удельная площадь достигала контрольных значений (Рис.47) (Таблица 4). Инфильтрация была представлена преимущественно макрофагами, тучными клетками и зрелыми фибробластами.

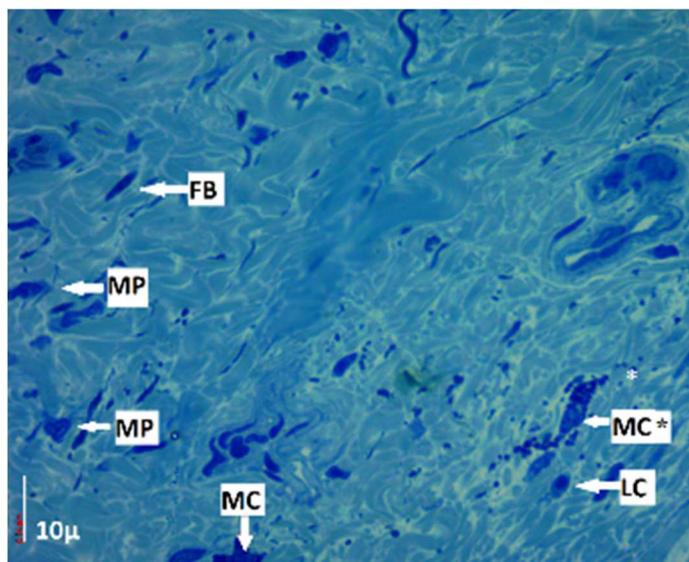


Рис.46. Клеточная инфильтрация в области раневого дефекта. 1-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Окраска: толуидиновый синий. Увеличение: 400.

MC – тучная клетка, MC* - частично дегранулирующая тучная клетка, LC – лимфоцит, FB – фибробласт, MP – макрофаг.

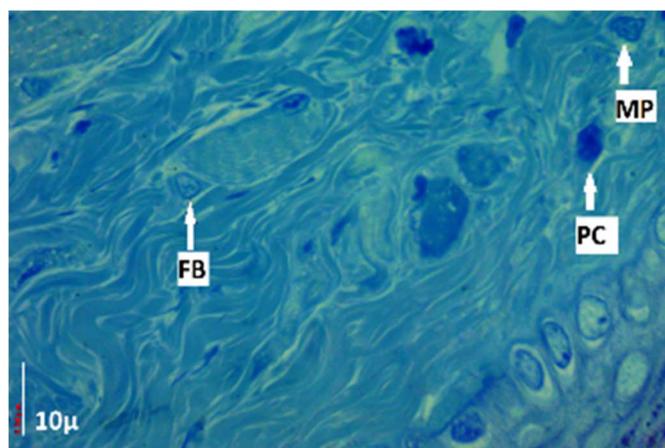


Рис.47. Собственная пластинка слизистой оболочки в области раневого дефекта. Гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 2-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Окраска: толуидиновый синий. Увеличение: 1000.

FB – фибробласт, MP – макрофаг.

Численная плотность макрофагов во 2-ой и 3-ей группах достигала показателей контрольной группы, что было в 6 раз достоверно меньше, чем в 1-ой группе ($p < 0,05$) (Таблица 5). При анализе их ультраструктуры в группе без покрытия обнаруживались признаки повышенной синтетической активности – гранулярный эндоплазматический ретикулум занимал большую часть цитоплазмы, его цистерны были расширены, комплекс Гольджи и полисомы были хорошо выражены, наблюдался процесс экзоцитоза микропиноцитозных везикул (Рис.48).

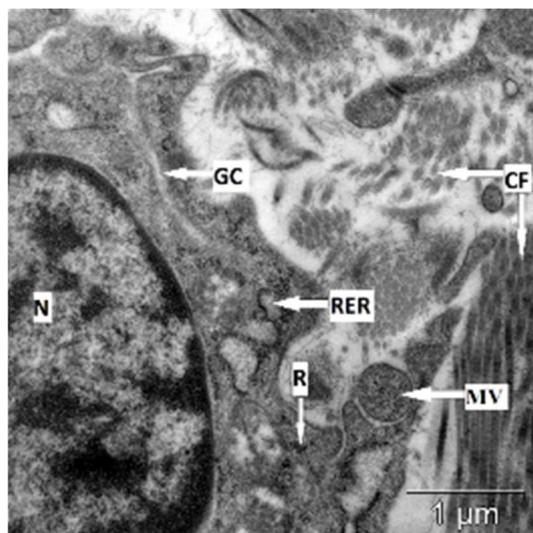
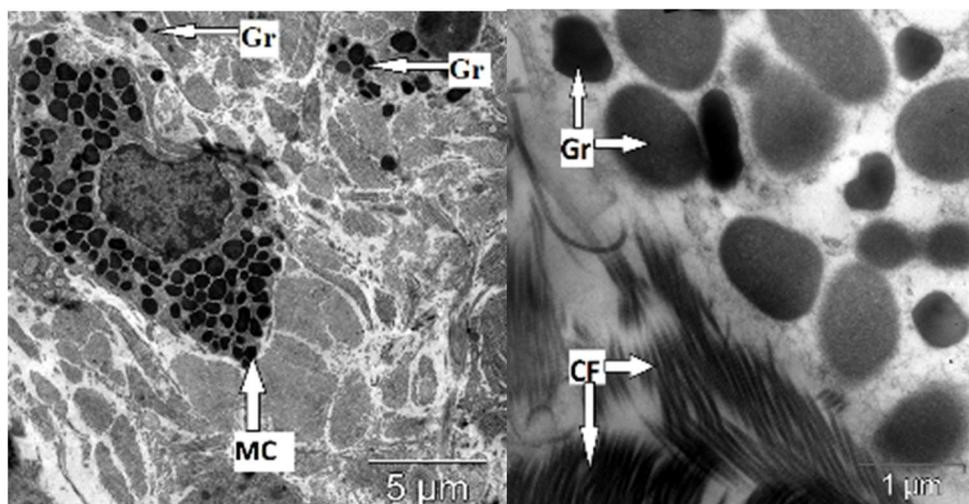


Рис.48. Макрофаг с высокой синтетической активностью. 1-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Увеличение: 20000

CF – соединительнотканые волокна, N – ядро, RER – гранулярный эндоплазматический ретикулум, R – полисомы, GC – комплекс Гольджи, MV – экзоцитоз микропиноцитозных везикул.

Численная плотность тучных клеток во 2-ой и 3-ей группах значимо не отличалась от группы контроля и была в 2,9 раз достоверно больше, чем в 1-ой группе ($p < 0,05$) (Таблица 5). При этом, в 1-ой экспериментальной группе тучные клетки находились в процессе дегрануляции (Рис.49а,б), в отличие от 2-ой и 3-ей групп (Рис.50).



а

б

Рис.49. Дегрануляция тучной клетки. 1-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Увеличение: а – 5000, б – 20000.

MC – тучная клетка, Gr – гранула, CF – соединительнотканное волокно.

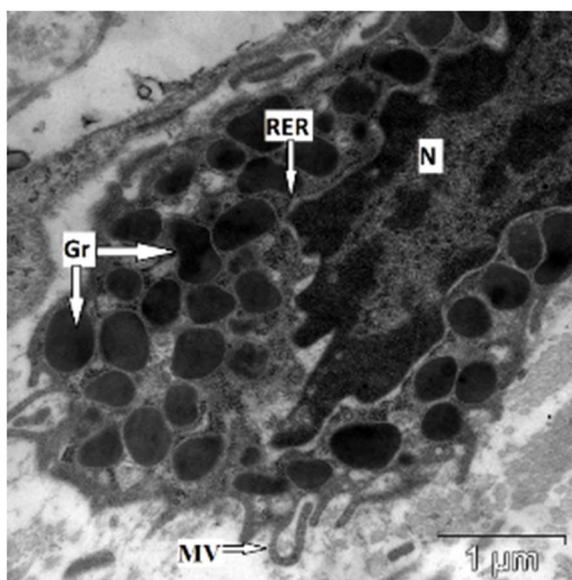


Рис.50. Функционально неактивная тучная клетка. Гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Увеличение: 20000.

N- ядро, Gr – гранулы, RER – гранулярный эндоплазматический ретикулум, MV - выросты плазмолеммы.

Численная плотность фибробластов в группах с раневым покрытием также достигала контрольных значений и была в 6,9 раз достоверно меньше, чем в группе без покрытия ($p < 0,05$) (Таблица 5). В случае 2-ой и 3-ей групп преобладали зрелые функционально неактивные клетки – фиброциты - узкие, вытянутые в длину, с ядром, занимающим практически всю площадь. Почти всю площадь ядра занимал гетерохроматин, свидетельствующий о снижении функциональной активности клеток. Экстрацеллюлярный отек вокруг клеток не определялся, зато визуализировались четко организованные коллагеновые волокна (Рис.51). В 1-ой группе по-прежнему преобладали формы с развитыми органеллами синтеза, отросчатой формы, с дисперсным хроматином (Рис.52).

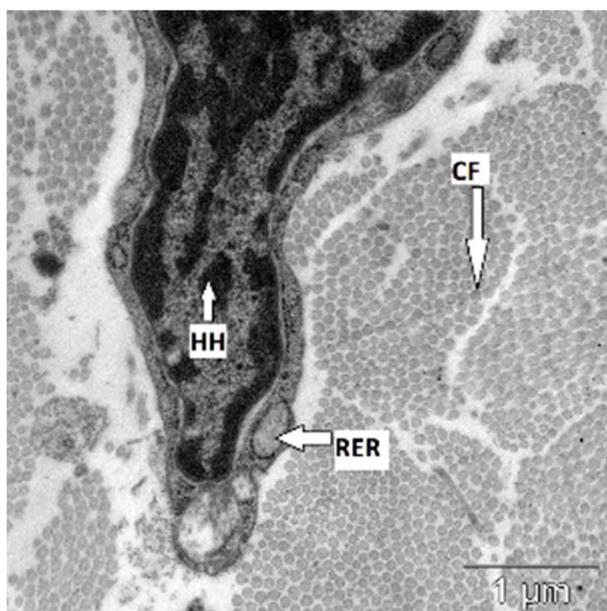


Рис.51. Фиброцит. Гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 2-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Увеличение: 20000.

НН - гетерохроматин, RER – гранулярный эндоплазматический ретикулум, CF – соединительнотканые волокна.

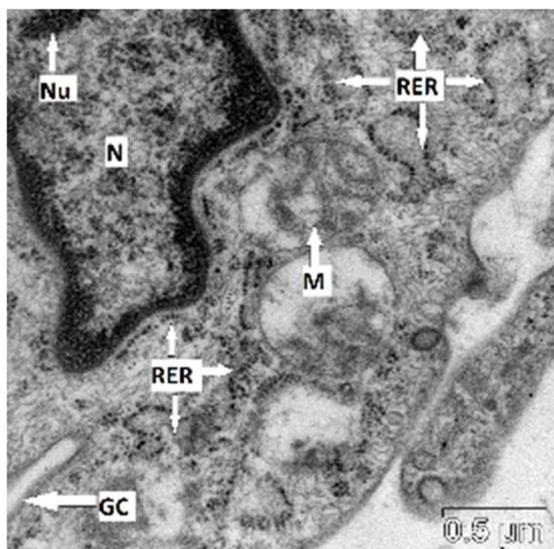


Рис.52. Зрелый синтетически активный фибробласт. 1-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Увеличение: 25000.

N – ядро, Nu - ядрышко, RER – гранулярный эндоплазматический ретикулум, GC – комплекс Гольджи, M – митохондрия.

На 12-е сутки исследования в 1-ой экспериментальной группе по-прежнему сохранялась нейтрофильная инфильтрация, численная плотность которой была в 4,6 раз больше, чем во 2-ой группе и в 38 раз больше, чем в 3-ей и контрольной группах ($p < 0,05$). Во 3-ей группе этот показатель достигал контрольных значений (Таблица 5).

Численная плотность плазмоцитов в группах с покрытием достоверно не отличалась от контрольной группы, но была 1,75 раз достоверно больше, чем в 1-ой группе ($p < 0,05$). Численная плотность лимфоцитов во всех экспериментальных группах снижалась по сравнению с 7-ми сутками, в 1,42 раза

для 1-ой, в 5 раз для 2-ой, в 6,7 раз для 3-ей группы ($p < 0,05$), но при этом не достигала контрольных значений ни в одной из них. Численная плотность эозинофилов во 2-ой и 3-ей группах достигала контрольных значений и была в 1,8 раз достоверно меньше, чем в 1-ой группе (Таблица 5).

Таким образом, при использовании полимерного пьезоэлектрического покрытия для лечения раневых дефектов слизистой оболочки полости рта наблюдалось более быстрая смена одних клеточных популяций на другие, отражающая последовательную смену стадий раневого процесса. Так же при защите от негативного воздействия со стороны агрессивных факторов внешней среды происходило более быстрое и качественное формирование волокнистого компонента. В группе без покрытия постоянная повторная травматизация и микробная контаминация раневого дефекта приводило к медленному формированию соединительнотканых волокон и преимущественному образованию плотной волокнистой соединительной ткани, являющейся основой рубца.

3.2.3. Восстановление трофического аппарата в области раневого дефекта на разных этапах его заживления при использовании полимерной пьезоэлектрической мембраны и без нее

3.2.3.1. Характеристика состояния сосудов микроциркуляторного русла в зависимости от методики ведения раневого дефекта на разных этапах его заживления

Основой физиологической регенерации тканей является высокая васкуляризация поврежденной области. Для ее осуществления необходимы как отсутствие патологических изменений в сосудах, окружающих место дефекта, так и быстрое и качественное формирование новых артериол, капилляров и венул.

На 3-и сутки исследования во всех экспериментальных группах по периферии раневого дефекта визуализировались артериолы, капилляры и венулы с признаками периваскулярного отека, которые были окружены отдельными дезорганизованными пучками коллагеновых волокон и клетками преимущественно макрофагального и фибробластического ряда (Рис.53, Рис.54, Рис.55).

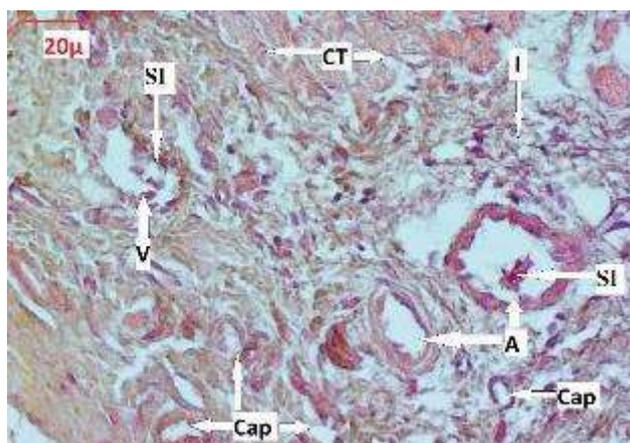


Рис.53. Сосуды микроциркуляторного русла с явлениями тромбоза, окруженные лимфогистиоцитарной инфильтрацией на периферии раневого дефекта. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. 1-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. Окраска: Гематоксилин и эозин. Увеличение: 400.

Cap – капилляр, V – венула, A – артериола, SI – сгусток, CT – соединительная ткань, I – лимфогистиоцитарная инфильтрация.

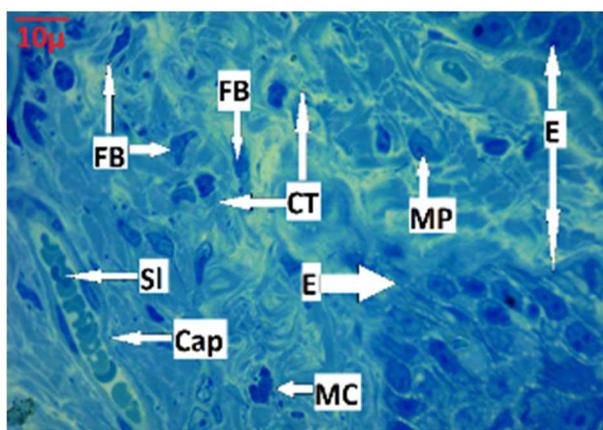


Рис.54. Капилляр с явлением сладжа форменных элементов, окруженный клетками воспалительной инфильтрации. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. 2-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. Окраска: толуидиновый синий. Увеличение: 1000.

Cap – капилляр, Sl – сладж форменных элементов, MC – тучная клетка, FB – фибробласт, MP – макрофаг, CT – соединительная ткань, E – эпителий.

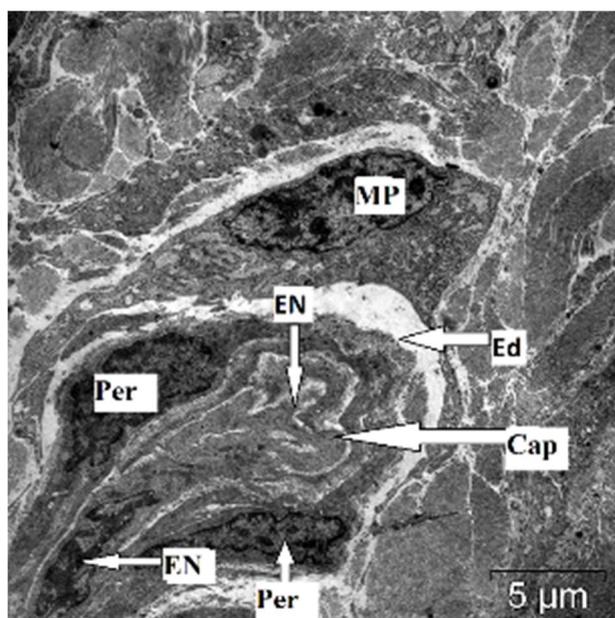


Рис.55. Суженный капилляр на периферии раневого дефекта с признаками периваскулярного отека. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. Увеличение: 5000

Cap - капилляр, Per – перицит, EN – эндотелиоцит, MP - макрофаг, Ed – периваскулярный отек.

Качественные изменения в сосудах сопровождались количественными изменениями показателей гемодинамики и микроциркуляции.

На периферии дефекта численная плотность не измененных артериол в 1 мм² среза во всех экспериментальных группах достоверно уменьшалась в 1,3 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$), что было связано с появлением

артериол с патологическими изменениями – явлениями сладжа, стаза и тромбоза. Численная плотность венул в 1 мм² среза без патологических изменений во всех экспериментальных группах достоверно не отличалась от контрольных значений. Тем не менее, во многих полях зрения встречались венулы с тромбозом и сладжем, что не свойственно для интактной слизистой оболочки. Численная плотность капилляров в 1 мм² среза достоверно не отличалась от показателей контрольной группы ($p > 0,05$) (Таблица 6).

Таблица 6. Удельная площадь и численная плотность сосудов слизистой оболочки полости рта в зависимости от методики лечения на 3-и, 7-е и 12-е сутки исследования М (Q1:Q3), %, количество клеток в 1мм² среза

	Удельная площадь артериол, %	Удельная площадь венул, %	Удельная площадь капилляров, %	Численная плотность не измененных артериол, в 1мм ² среза	Численная плотность не измененных артериол, в 1мм ² среза	Численная плотность не измененных венул, в 1мм ² среза	Численная плотность не измененных венул, в 1мм ² среза	Численная плотность капилляров, в 1мм ² среза	Удельная площадь сосудов в грануляционной ткани, в 1мм ² среза
Контроль (n=5)	2,3 (2,2;2,3)	5,4 (5,2;6,65)	1,34(0,95;1,68)	65,9 (62,2;68,3)	-	79,4(76,85;83,4)	-	189,4 (185,2;193,1)	-
3-и сутки									
1-я группа (n=5)	1,4 (1,3;1,5)*	7,4 (7,2;7,5)*	3,1 (2,9;3,2)*	51,7 (50,7;53,2)*	5,2 (5,0;5,3)*	60,4 (58,85;62,15)	12,7 (12,1;13,1)*	201,6 (200,05;203,55)	42,2 (40,45;43,3)*
2-я группа (n=5)	1,5 (1,4;1,6)*	7,6 (7,5;7,8)*	3,2 (3,0;3,3)*	52,2 (51,15;53,0)*	4,7 (4,6;4,7)*	65,5 (64,4;66,65)	12,5 (11,85;12,7)*	201,7 (201,3;205,2)	49,5 (48,9;50,9)*
3-я группа (n=5)	1,4 (1,2;1,5)*	7,7 (7,6;7,8)*	3,3 (3,2;3,4)*	54,4 (53,5;55,15)*	3,9 (3,7;4,0)*	69,9 (69,25;70,5)	10,8 (10,4;11,15)*	204,6 (203,4;205,3)	51,5 (50,85;52,3)*
7-е сутки									
1-я группа (n=5)	1,6 (1,5;1,7)*	8,1 (8,02;8,2)*	3,5 (3,4;3,6)*	63,3 (62,6;63,7)	4,3 (4,2;4,5)*	62,7 (61,9;64,3)	10,45 (10,1;10,87)*	205,85 (204,62;207,1)*	17,4 (16,6;17,75)*
2-я группа (n=5)	1,9 (1,75;2,0)*	7,05 (6,8;7,3)*	2,5 (2,4;2,6)*	67,5 (67,2;67,9)	1,1 (1,0;1,2)#	66,7 (65,7;67,1)	6,15 (6,0;6,3)#*	210,6 (209,9;210,9)*	24,8 (24,1;25,3)#*
3-я группа (n=5)	2,2 (2,1;2,3)#	6,05 (5,82;6,2)#	1,9 (1,8;2,0)#	72,5 (72,1;72,7)#	0,8 (0,7;0,9)#	77,3 (76,7;77,8)#	3,4 (3,3;3,5)#*	218,4 (218,05;218,9)*	27,0 (26,5;27,4)#*
12-е сутки									
1-я группа (n=5)	1,4 (1,2;1,5)*	4,1 (3,9;4,45)*	0,8 (0,8;0,9)*	46,7 (46,1;47,25)*	2,2 (2,0;2,4)*	57,8 (56,75;58,7)	6,8 (6,5;7,1)*	144,8 (143,2;146,9)*	-
2-я группа (n=5)	2,7 (2,55;2,9)#	6,1 (6,0;6,2)#	1,8 (1,7;1,9)#	72,3 (71,7;72,8)#	0 (0;0,6)#	80,3 (79,1;81,9)#	1,8 (0;2,1)#	221,5 (166,5;223,2)#	-
3-я группа (n=5)	3,2 (3,05;3,4)#	6,3 (6,2;6,5)#	2,1 (1,9;2,1)#	73,4 (72,8;73,6)#	0 (0;0,4)#	83,0 (82,3;83,75)#	0 (0;0,7)#	231,5 (230,5;233,2)#	-

*-достоверные различия по сравнению с контрольной группой (p≤0,05).

#-достоверные различия по сравнению с группой, в которой не использовалось раневое покрытие (p≤0,05).

Наблюдалось значимое сужение просвета артериол и расширения просвета венул и капилляров. Диаметр первых во всех экспериментальных группах достоверно уменьшался в 1,4 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Диаметр венул значимо увеличивался в 1,4, а капилляров в 1,6 раз по сравнению с интактной слизистой оболочкой для всех экспериментальных групп ($p < 0,05$) (Таблица 7).

Таблица 7. Диаметр сосудов слизистой оболочки полости рта в зависимости от методики лечения на 3-и, 7-е и 12-е сутки исследования М (Q1:Q3), мкм

	Диаметр артериол	Диаметр венул	Диаметр капилляров
Контроль	21,6 (21;22,95)	30,1 (29,4;32,1)	7,6 (7,25;8,4)
3-и сутки			
1-я группа	15,7(15,35;16,1)*	40,8(39,95;41,6) *	11,4(10,9;11,5)*
2-я группа	16,9(16,6;17,1)*	41,7(41,1;42,5)*	12,0(11,8;12,4)*
3-я группа	17,8(17,6;18,0)*	39,9(39,4;40,2)*	12,0(11,9;12,1)*
7-е сутки			
1-я группа	17,4(17,1;17,8)*	38,2(37,7;39,1)*	10,3(10,1;10,8)*
2-я группа	19,0(18,7;19,3)	36,4(35,9;36,7)*	10,9(10,7;11,1)*
3-я группа	25,5(24,2;24,7)#	32,3(31,8;32,6)	7 (6,9;7,2)#
12-е сутки			
1-я группа	19,2(18,65;19,35)	32,7(32,4;33,3)	8,1(7,9;8,25)
2-я группа	22,4(21,6;22,7)	31,4(30,9;32,2)	8,2(7,85;8,55)
3-я группа	22,5(21,85;23,05)	29,0(28,35;29,4)	7,8(7,65;8,1)

*-достоверные различия по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$).

#-достоверные различия по сравнению с группой, в которой не использовалось раневое покрытие ($p \leq 0,05$).

В связи с этим во всех экспериментальных группах удельная площадь артериол значимо уменьшалась в 1,65 раз, а удельная площадь венул и капилляров достоверно увеличивалась в 1,4 и 2,4 раза по сравнению с

контрольной группой ($p < 0,05$) (Таблица 6). На фоне изменения диаметра просвета сосудов микроциркуляторного русла изменялось артериоло-веноулярное взаимоотношение, которое для всех экспериментальных групп достоверно уменьшалось в 1,9 раз по сравнению с показателями контрольной группы ($p < 0,05$) (Таблица 8).

Таблица 8. Показатели гемодинамики сосудов слизистой оболочки полости рта в зависимости от методики лечения на 3-и, 7-е и 12-е сутки исследования М (Q1:Q3), усл.ед.

	Артериоло-веноулярное взаимоотношение	Индекс перикапиллярной диффузии	Индекс Керногана
Контроль	0,72 (0,67;0,76)	6,04(4,65;8,29)	0,61(0,56;0,65)
3-и сутки			
1-я группа	0,38(0,37;0,39)*	3,6(3,4;3,8)*	1,22(1,18;1,28)*
2-я группа	0,4(0,39;0,41)*	3,8(3,6;4,01)*	1,12(1,1;1,14)*
3-я группа	0,44(0,44;0,45)*	3,6(3,4;3,75)*	1,01(1,0;1,04)*
7-е сутки			
1-я группа	0,45(0,44;0,46)*	3,0(2,8;3,1)*	1,16(1,12;1,21)*
2-я группа	0,52(0,51;0,53)*	4,3(4,1;4,4)*#	0,83(0,81;0,84)*#
3-я группа	0,76(0,74;0,77)#	3,6(3,5;3,9)*#	0,56(0,55;0,57)#
12-е сутки			
1-я группа	0,57(0,56;0,59)*	3,8 (3,1;4,5)*	0,83(0,82;0,85)*
2-я группа	0,7(0,67;0,72)#	4,6(4,2;4,9)#	0,59(0,55;0,61)#
3-я группа	0,77(0,75;0,79)#	4,85(4,59;4,95)#	0,53(0,52;0,55)#

*-достоверные различия по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$).

#-достоверные различия по сравнению с группой, в которой не использовалось раневое покрытие ($p \leq 0,05$).

Изменениям подвергались и морфометрические показатели, отражающие гемодинамику микроциркуляторного русла. Индекс перикапиллярной диффузии, показывающий площадь ткани, которую кровоснабжает один капилляр, достоверно уменьшался в сравнении с интактной тканью в 1,7 раз для всех экспериментальных групп ($p < 0,05$), что

свидетельствовало об ишемии тканей. Индекс Керногана достоверно увеличивался в 2 раза для 1-ой группы, в 1,8 для 2-ой и в 1,6 раз 3-ей экспериментальных групп ($p < 0,05$), что отражало нарушение пропускной способности артериол в связи с сужением их просвета и утолщением сосудистой стенки (Таблица 8).

В области раневого дефекта на 3-и сутки определялись новообразованные тонкостенные сосуды (Рис.56). Их удельная площадь во всех экспериментальных группах занимала половину общей площади грануляционной ткани (Таблица 6).

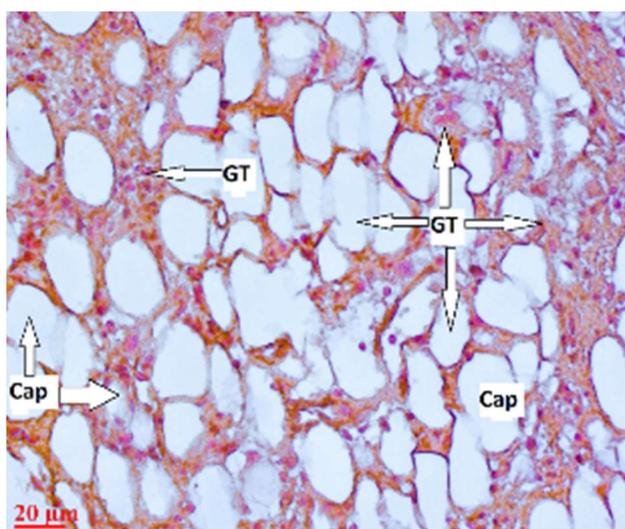


Рис.56. Новообразованные сосуды грануляционной ткани. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. Окраска: Гематоксилин и эозин. Увеличение: 400.

Cap – капилляр, GT – грануляционная ткань.

Их эндотелиоциты активно экспрессировали VEGF (Рис.57 аб). При этом подсчитываемый показатель H-score достоверно не отличался между 2-й и 3-й группами группами ($p < 0,05$), но был в 1,4 и 4,7 раз достоверно больше, чем в 1-ой и контрольной группах ($p < 0,05$) (Таблица 9).

Таблица 9. Экспрессия VEGF и CD-34 в эндотелии сосудов слизистой оболочки полости рта в зависимости от методики лечения на 3-и, 7-е и 12-е сутки исследования М (Q1:Q3), усл.ед, H-score

	VEGF	CD-34
Контроль	80.0 (75.0;85.0)	110.0 (105.0;118.7)
3-и сутки		
1-я группа	275.0 (265.0;290)*	60.0 (55.0;65.0)*
2-я группа	365.0 (360.0;372.5)*#	157.5 (155.0;163.7)*#
3-я группа	375.0 (370.0;380.0)*#	200.0 (195.0;200.0)*#
7-е сутки		
1-я группа	165.0 (155.0;175.0)*	135.0 (130.0;140.0)*
2-я группа	255.0 (250.0;265.0)*#	235.0 (230.0;240.0)*#
3-я группа	275.0 (362.5;282.5)*#	285.0(280.0;290.0)*#
12-е сутки		
1-я группа	55.0 (55.0;60.0)*	60.0 (55.0;65.0)*
2-я группа	130.0 (125.0;140.0)*#	145.0 (140.0;145.0)*#
3-я группа	120.0 (125.0;135.0)*#	110.0(105.0;115.0)#

*-достоверные различия по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$).

#-достоверные различия по сравнению с группой, в которой не использовалось раневое покрытие ($p \leq 0,05$).

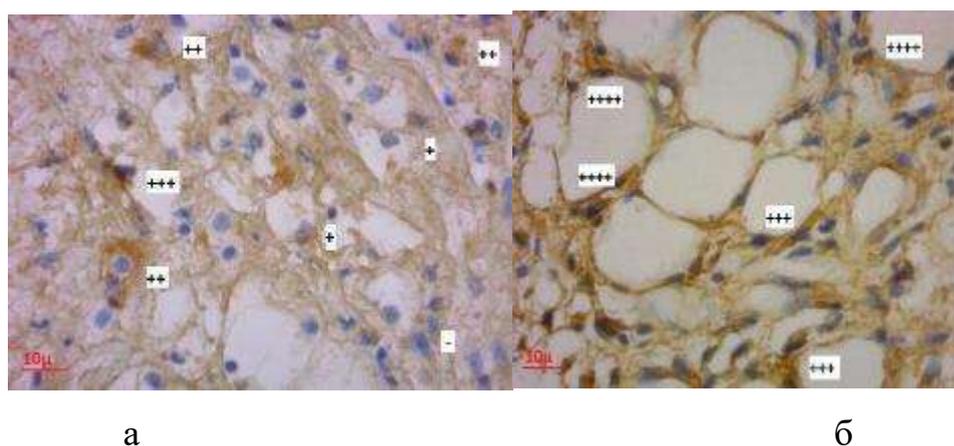


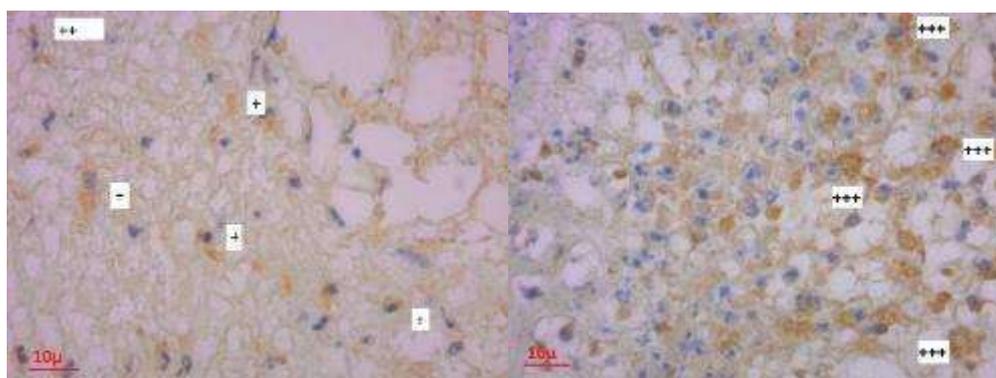
Рис.57. Экспрессия VEGF в эндотелиоцитах грануляционной ткани, докрасивание ядер гематоксилином. а – 1-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. б – гистологическая картина, характерная для 2-ой

и 3-ей экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования.

Увеличение: 900.

++++ - Очень сильное окрашивание, +++ - сильное окрашивание, ++ - умеренное окрашивание, + - слабое окрашивание, - - нет окрашивания.

Экспрессия CD-34 в группе без покрытия достоверно снижалась в 1,8 раз по сравнению с контрольными значениями, в то время как во 2-ой и 3-ей группах этот показатель увеличивался в 1,4 и 1,8 раз по сравнению с интактной слизистой оболочкой ($p < 0,05$) (Таблица 9) (Рис.58аб). В 1-ой группе определялась достоверная корреляция ($r=0.3$, $p < 0,05$) между повышенной численной плотностью нейтрофилов и снижением экспрессии CD34, что, вероятно, свидетельствовало о том, что в условиях повышенного воспалительного ответа нарушается созревание сосудов. Обратная взаимосвязь наблюдалась в 3-ей группе на фоне более низкого значения численной плотности нейтрофилов ($r=-0.3$, $p < 0,05$).



а

б

Рис.58. Экспрессия CD-34 в эндотелиоцитах грануляционной ткани, докрасивание ядер гематоксилином. а – 1-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. б – гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа 3-и сутки исследования.

Увеличение: 900.

++++ - Очень сильное окрашивание, +++ - сильное окрашивание, ++ - умеренное окрашивание, + - слабое окрашивание, - - нет окрашивания.

В группе без покрытия плазмолемма эндотелиоцитов новообразованных сосудов не образовывала микроворсинки в люминальную сторону, что свидетельствовало о нарушении транскапиллярного обмена. Эндотелиальная выстилка и базальная мембрана капилляров грануляционной ткани были тонкими, межэндотелиальные пространства расширенными. Эндотелиоциты были бедны органеллами: эндоплазматический ретикулум и комплекс Гольджи представлены скудно. Полисомы встречались редко, митохондрии были отечными и увеличивались в размерах.

В группах с покрытием в области люминального края сосудов в эндотелиоцитах визуализировалось большое количество микропиноцитозных пузырьков и многочисленные микроворсинки, что являлось признаком активного транскапиллярного обмена. В цитоплазме эндотелиоцитов хорошо визуализировались митохондрии, гранулярный эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи (Рис.59, Рис.60а,б).

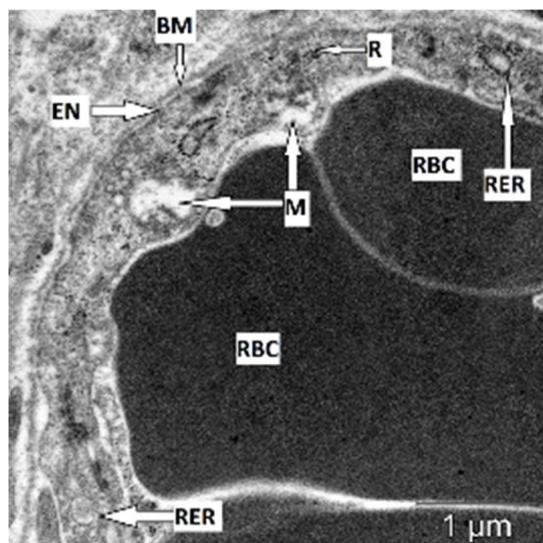


Рис.59. Капилляр формирующейся грануляционной ткани с истонченной эндотелиальной выстилкой, признаками нарушения транскапиллярного обмена и сладжем форменных элементов в просвете сосуда. 1-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. Увеличение: 20000.

EN – эндотелиоцит, RBC – эритроцит, BM – базальная мембрана, RER – гранулярный эндоплазматический ретикулум, М – митохондрия, R – полисомы.

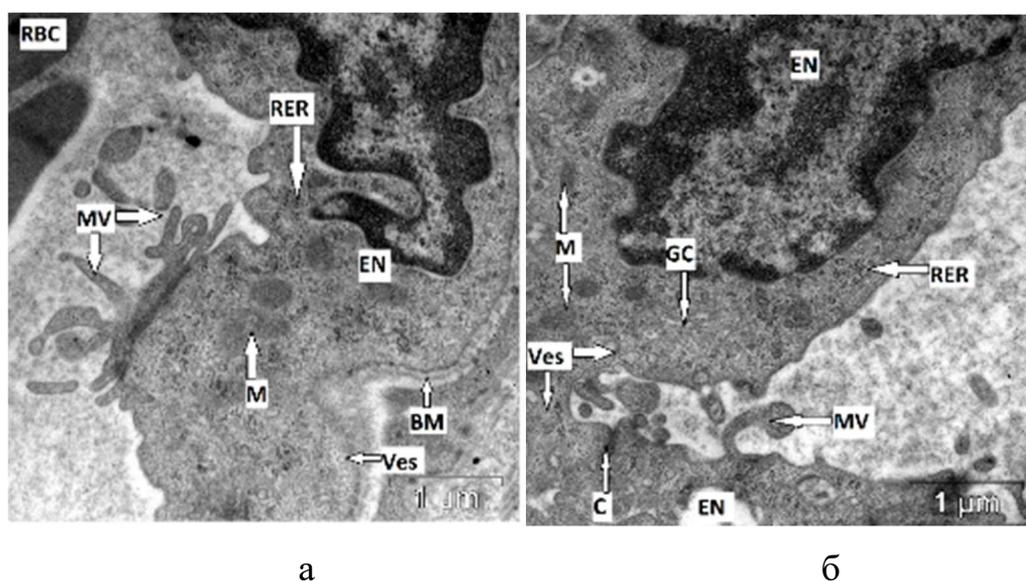


Рис.60. Капилляры грануляционной ткани с признаками активации транскапиллярного обмена и синтетических процессов. а - 2-я экспериментальная группа, б - 3-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. Увеличение: 20000.

EN – эндотелиоцит, RBC – эритроцит, С – межклеточный контакт, BM – базальная мембрана, MV – выросты плазмолеммы, Ves – микропиноцитозные пузырьки, RER – гранулярный эндоплазматический ретикулум, М – митохондрия, GC – комплекс Гольджи.

На 7-е сутки исследования на краях раневого дефекта определялись артериолы, венулы и капилляры. В группе без покрытия выраженность

периваскулярного отека, а также явления тромбоза, стаза и сладжа форменных элементов была выше, чем в группах с его использованием (Рис.61, Рис.62а,б, Рис.63а,б).

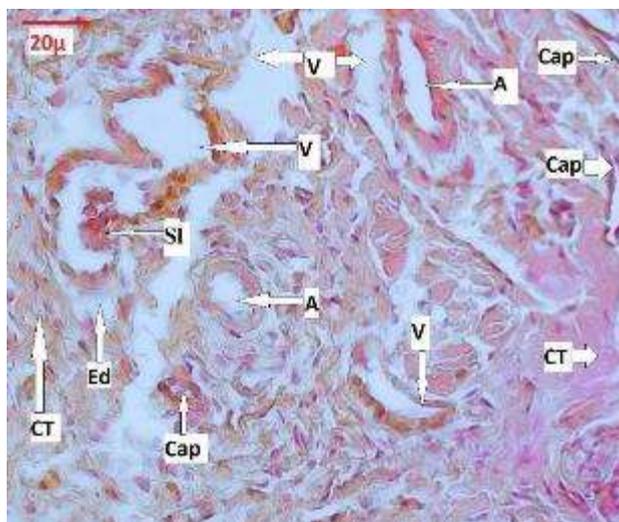
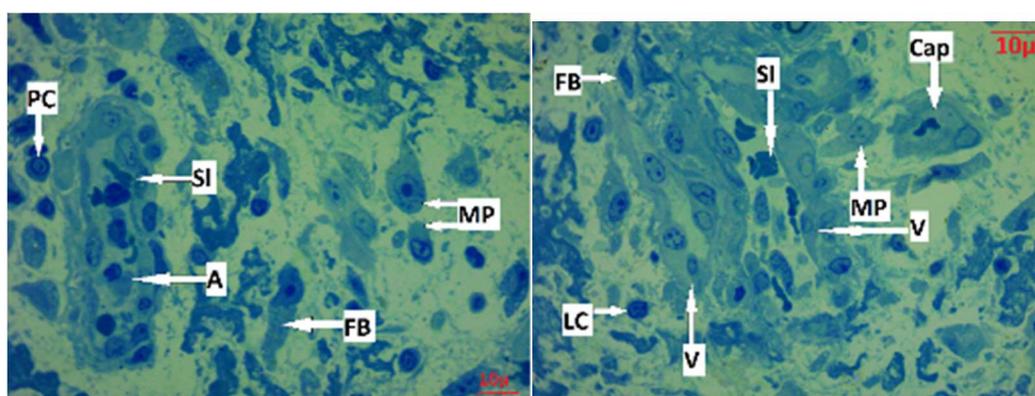


Рис.61. Сосуды микроциркуляторного русла со сладжем форменных элементов и периваскулярным отеком. 3-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. Окраска: Гематоксилин и эозин. Увеличение: 400.

Cap – капилляр, V – венула, A – артериола, T – тромбоз, CT – соединительная ткань.



а

б

Рис.62. Сосуды микроциркуляторного русла с явлением сладжа и стаза форменных элементов, окруженный клетками лимфогистиоцитарной инфильтрации. а - 1-я экспериментальная группа, б

– 2-я экспериментальная группа. 7 - е сутки исследования. Окраска: толуидиновый синий. Увеличение: 1000.

A – артериола, *V* – венула, *Cap* – капилляр, *Sl* – сладж форменных элементов, *PC* – плазмоцит, *LC* – лимфоцит, *FB* – фибробласт, *MP* – макрофаг.

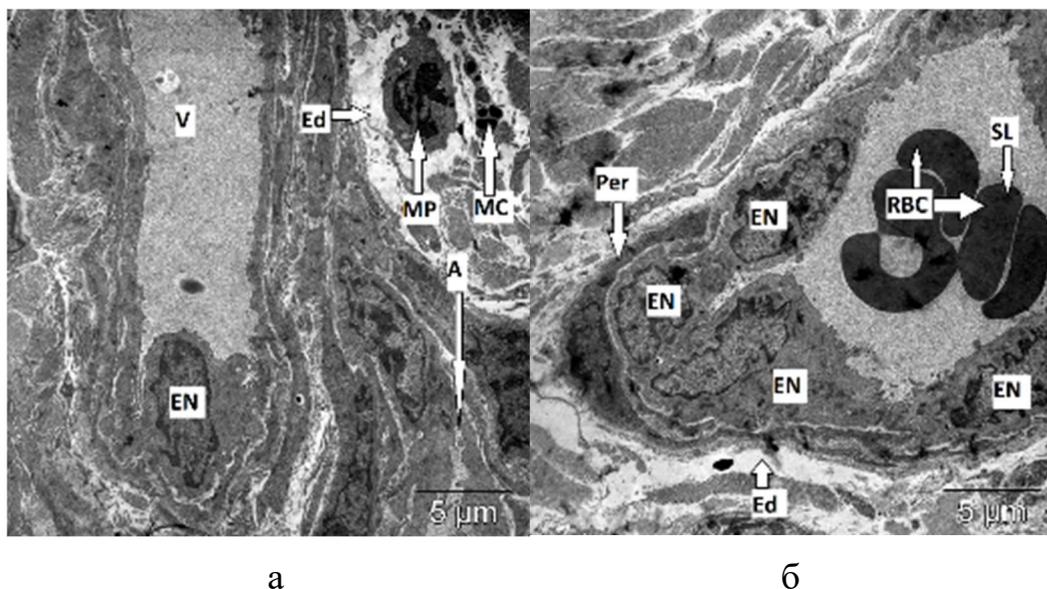
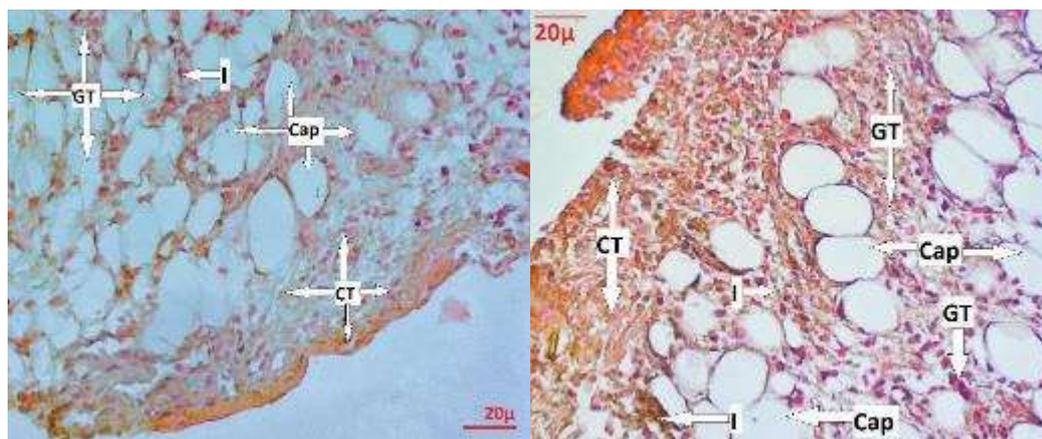


Рис.63. а - венула в области регенерирующего раневого дефекта со сладжем форменных элементов и периваскулярным отеком. 1-я экспериментальная группа. *б* -венула в области регенерирующего раневого дефекта с остаточными признаками периваскулярного отека. 3-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. Увеличение: 5000.

A – артериола, *V* – венула, *EN* – эндотелиоцит, *Per* – перицит, *RBC* – эритроцит, *MP* – макрофаг, *MC* – тучная клетка, *SL* – сладж, *Ed* – отек.

Вокруг сосудов между новообразованными волокнами соединительной ткани встречались клетки воспалительного инфильтрата. (*Рис.64а,б*, *Рис.65а,б,с*).

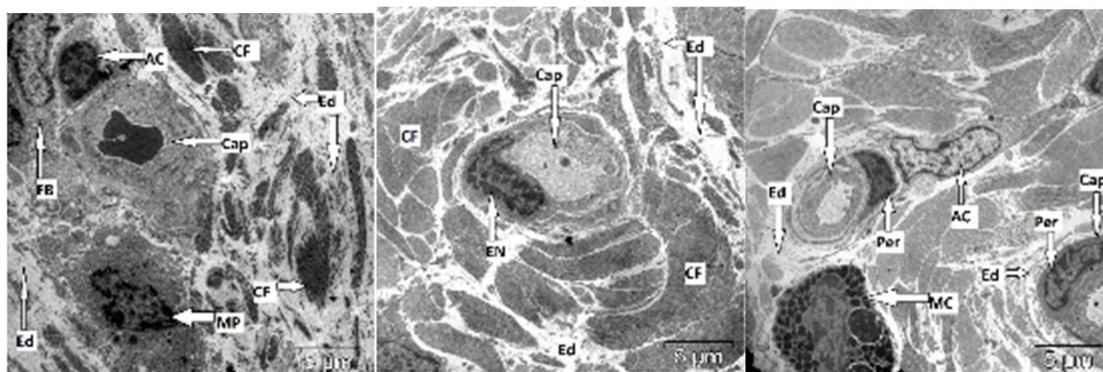


а

б

Рис.64. Новообразованные сосуды грануляционной ткани. а - 1-я экспериментальная группа, б - 2-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. Окраска: Гематоксилин и эозин. Увеличение: 400.

Cap – капилляр, GT – грануляционная ткань, Cap – капилляры, I – инфильтрация, CT – соединительная ткань.



а

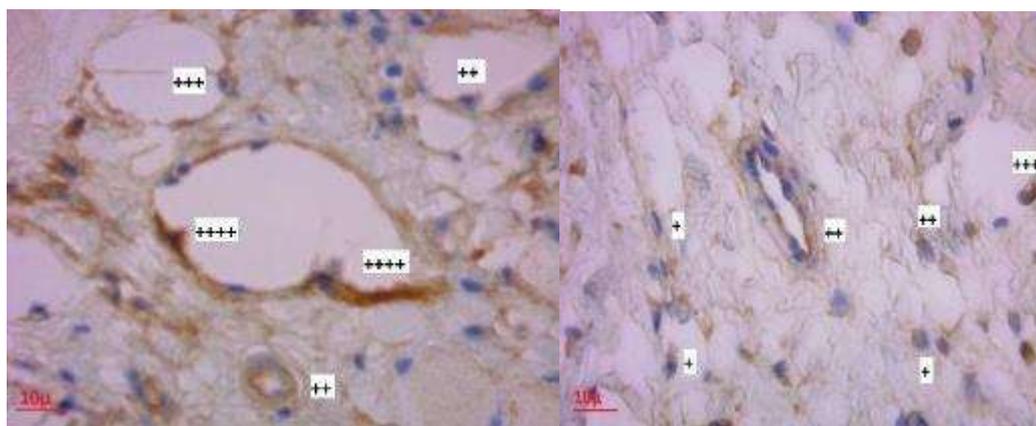
б

с

Рис.65. а – капилляр на месте раневого дефекта с выраженным периваскулярным отеком, окруженный клетками воспалительного инфильтрата, 1-я экспериментальная группа. б – капилляр на месте раневого дефекта с периваскулярным отеком., 2-я экспериментальная группа. с – капилляр на месте раневого дефекта в окружении сформированных соединительнотканых волокон, со слабовыраженным периваскулярным отеком. 3-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. Увеличение: 5000.

Cap – капилляр, *AC* – адвентициальная клетка, *Per* – перицит, *EN* – эндотелиоцит, *FB* – фибробласт, *MP* – макрофаг, *MC* – тучная клетка, *Ed* – периваскулярный отек, *CF* – волокна коллагена.

Экспрессия VEGF у новообразованных сосудов снижалась по сравнению с 3-ми сутками, достоверно не отличаясь между 2-ой и 3-ей экспериментальными группами (Рис.66а) ($p > 0,05$), но была в 1,7 и 3,6 раз достоверно больше, чем в 1-ой (Рис.66б) и контрольной группах ($p < 0,05$) (Таблица 9). Наблюдалась достоверная ($r = -0.35$, $p < 0.05$) прямая корреляция между увеличенной численной плотностью нейтрофилов и низкими значениями H-score для VEGF в 1-ой группе, которая сохранялась до 12-ых суток исследования.



а

б

Рис.66. Экспрессия VEGF в эндотелиоцитах грануляционной ткани, докрашивание ядер гематоксилином а – гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 2-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. б – 1-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования.

Увеличение: 900.

++++ - Очень сильное окрашивание, +++ - сильное окрашивание, ++ - умеренное окрашивание, + - слабое окрашивание, - - нет окрашивания.

Экспрессия CD34 на этом этапе восстановления сосудистого русла достоверно повышалась во всех экспериментальных группах в 1,2 раза для 1-ой группы, в 2,1 раз для 2-ой и 2,6 раз для 3-ей групп по сравнению с контрольными значениями ($p < 0,05$) (Таблица 9) (Рис.67а,б).

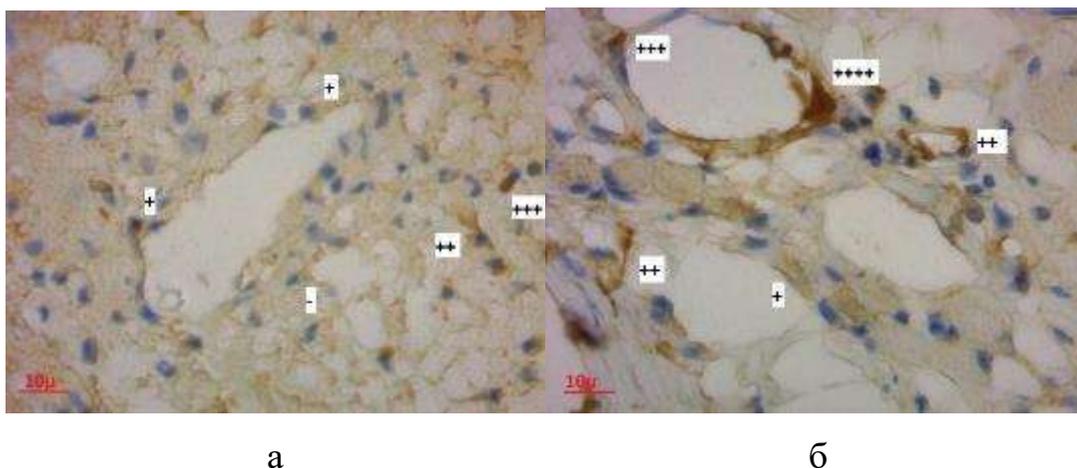


Рис.67. Экспрессия CD34 в эндотелиоцитах грануляционной ткани, докрасивание ядер гематоксилином. А – 1-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. В – гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 2-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования.

Увеличение: 900.

++++ - Очень сильное окрашивание, +++ - сильное окрашивание, ++ - умеренное окрашивание, + - слабое окрашивание, - - нет окрашивания.

На ультраструктурном уровне в эндотелиоцитах новообразованных сосудов 1-ой экспериментальной группы гранулярный эндоплазматический ретикулум и комплекс Гольджи практически не визуализировались, полисомы встречались редко, отдельными скоплениями, кристы митохондрий были деструктурированы. Микроворсинки и микропиноцитозные пузырьки практически не выявлялись (Рис.68).

В группах, где использовалась полимерная пьезоэлектрическая мембрана, наблюдались хорошо выраженные органеллы синтеза, большое количество митохондрий со структурированными кристами. Наблюдались признаки высокого транскапиллярного обмена – имелись множественные выросты люминальной поверхности плазмолеммы, микропиноцитозные пузырьки были представлены в большом количестве, между перицитами и эндотелиоцитами образовывались межклеточные контакты. Базальная мембрана сосудов была непрерывной, равномерной по толщине (Рис.69а,б).

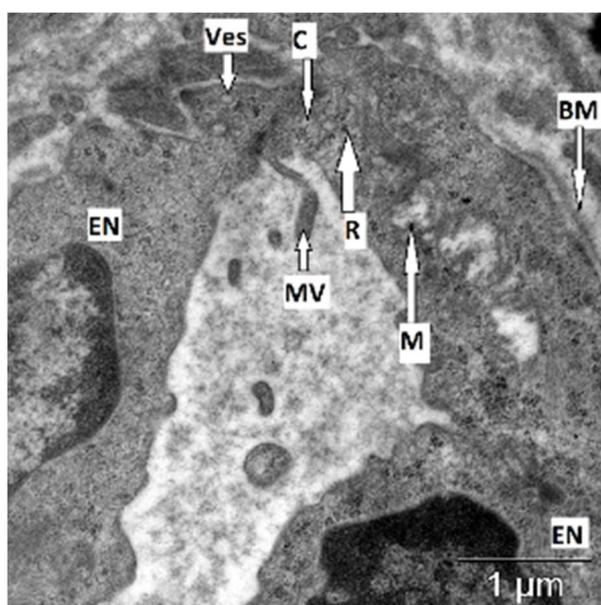


Рис.68. Капилляр с деструкцией митохондрий и признаками снижения транскапиллярного обмена. 1-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. Увеличение: 20000.

EN – эндотелиоцит, BM – базальная мембрана, C – интердигитация, M – митохондрии, R – полисомы, MV – микроворсинки, Ves – микропиноцитозные пузырьки

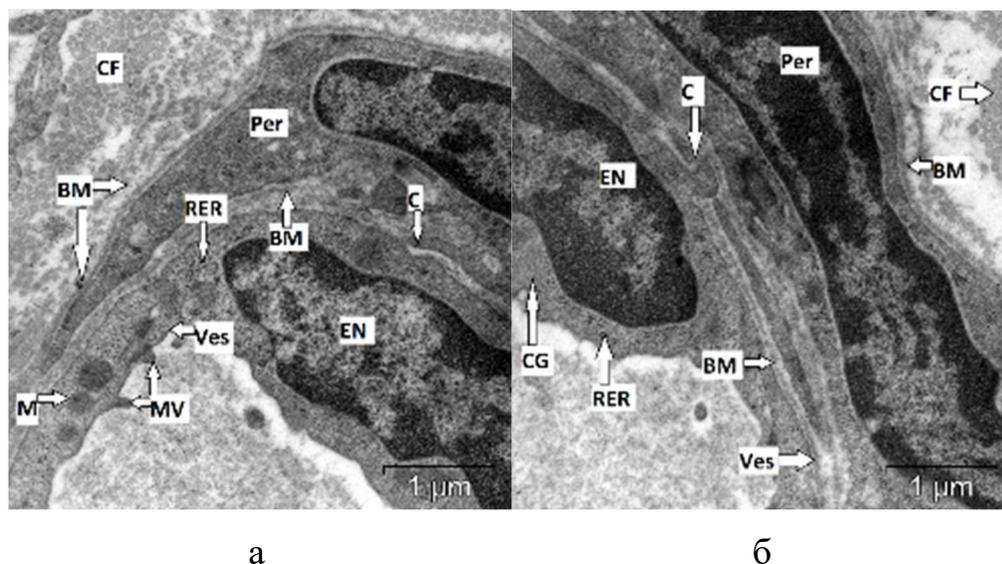


Рис.69. Интердигитация между эндотелиоцитом и перицитом капилляра на месте раневого дефекта. 2-я экспериментальная группа. Увеличение: 20000.

EN – эндотелиоцит, *Per* – перицит, *BM* – базальная мембрана, *C* – межклеточный контакт, *M* – митохондрии, *R* – полисомы, *RER* – гранулярный эндоплазматический ретикулум, *GC* – комплекс Гольджи, *MV* – микроворсинки, *Ves* – микропиноцитозные пузырьки, *CF* – коллагеновые волокна.

На 7-е сутки исследования происходило постепенное восстановление количественных показателей микроциркуляции на периферии раневого дефекта. Численная плотность неизмененных артериол и венул в 1 мм² среза во всех экспериментальных группах была на уровне контрольных значений. Тем не менее, по-прежнему наблюдались сосуды с явлениями сладжа, стаза и тромбоза. Численная плотность измененных венул в 1 мм² среза в группе без покрытия достоверно не изменялась по сравнению с 3-ми сутками исследования и была в 5,3 раза достоверно больше, чем во 2-ой и 3-ей группах соответственно ($p < 0,05$). Аналогичный показатель во 2-ой и 3-ей экспериментальных группах уменьшился в 4,2 и 4,8 раз по сравнению с 3-ми сутками ($p < 0,05$). Численная плотность измененных венул в 1 мм² среза

в 1-ой экспериментальной группе также значимо не изменилась по сравнению с 3-ми сутками и была в 1,7 и 3 раза достоверно больше, чем во 2-ой и 3-ей экспериментальных группах соответственно ($p < 0,05$). При этом во 2-ой и 3-ей экспериментальных группах данный показатель достоверно уменьшался в 2 и 3,2 раза по сравнению с 3-ми сутками исследования ($p < 0,05$) (Таблица 6).

В 3-ей экспериментальной группе до контрольных значений восстанавливались диаметр артериол, венул и капилляров и, как следствие, артериоло-венулярное взаимоотношение (Таблица 7, Таблица 8). В связи с восстановлением численной плотности и диаметра сосудов микроциркуляторного русла в 3-ей экспериментальной группе, контрольных значений достигала их удельная площадь (Таблица 6).

Во 2-ой экспериментальной группе контрольных значений достигал только диаметр артериол. Диаметр венул и капилляров был в 1,3 и 1,4 раз достоверно больше, чем в группе контроля соответственно ($p < 0,05$) (Таблица 7). Артериоло-венулярное взаимоотношение значимо не изменилось по сравнению с 3-ми сутками исследования ($p > 0,05$) и было в 1,4 раза достоверно меньше аналогичного показателя в контрольной группе ($p < 0,05$) (Таблица 8).

В группе без покрытия ни один из данных показателей не достигал контрольных значений – диаметр артериол был в 1,3 раза достоверно меньше, диаметр венул и капилляров в 1,3 и 1,4 раза достоверно больше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$), значимо не изменившись по сравнению с 3-ми сутками исследования ($p > 0,05$) (Таблица 7). Артериоло-венулярное взаимоотношение значимо не изменилось по сравнению с 3-ми сутками исследования ($p > 0,05$) и было в 1,6 раз достоверно меньше аналогичного показателя в контрольной группе ($p < 0,05$) (Таблица 8).

Индекс перикапиллярной диффузии во 2-ой и 3-ей экспериментальной группах был в 1,4 и 1,2 раза достоверно больше, чем в

1-ой группе, но по-прежнему значимо отличался от показателей контрольных значений ($p < 0,05$) (Таблица 8).

Индекс Керногана восстанавливался только в 3-ей экспериментальной группе и был в 2 раза достоверно меньше, чем в 1-ой группе ($p < 0,05$). Во 2-ой группе данный показатель был в 1,4 раза достоверно меньше, чем в 1-ой группе ($p < 0,05$), но при этом был в 1,4 раза достоверно больше, чем группе контроля ($p < 0,05$).

На 12-е сутки исследования в сформированной на месте раневого дефекта соединительной ткани обнаруживались новообразованные сосуды, особенно развитые в области сосочкового слоя собственной пластинки слизистой оболочки щеки (Рис.70).

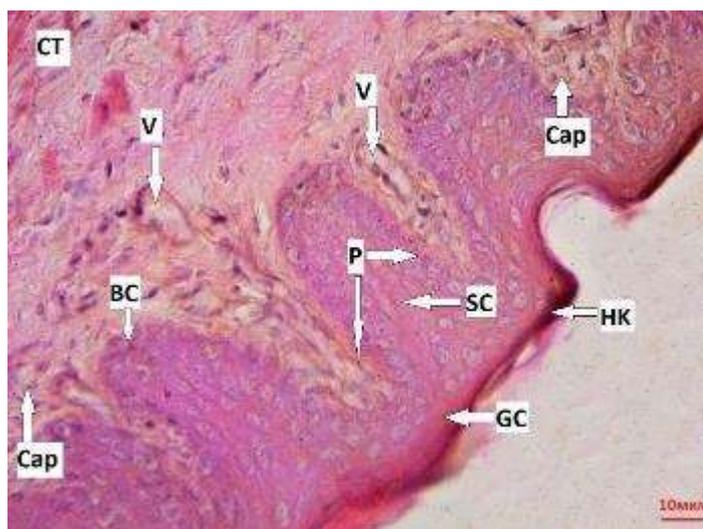


Рис.70. Новообразованные сосуды на месте сформированного раневого дефекта. 2-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение: 400.

СТ – соединительная ткань, BC – базальные клетки, SC – клетки шиповатого слоя, GC – поверхностный слой, НК – роговой слой, P – сосочки, V – вены, Cap – капилляры.

В группах без покрытия по-прежнему наблюдалось сужение артериол и полнокровие венул, явления сладжа, что было не свойственно для групп с покрытием (Рис.71, Рис.72).

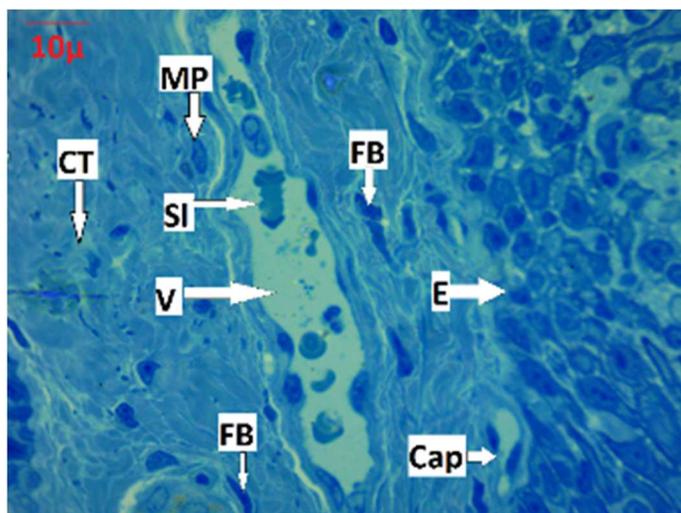


Рис.71. Сосуды микроциркуляторного русла с явлением сладжа форменных элементов. 1-я экспериментальная группа. 12 - е сутки исследования. Окраска: толуидиновый синий. Увеличение: 1000.

V – венула, *Cap* – капилляр, *SI* – сладж форменных элементов, *FB* – фибробласт, *MP* – макрофаг, *CT* – соединительная ткань, *E* – эпителий.

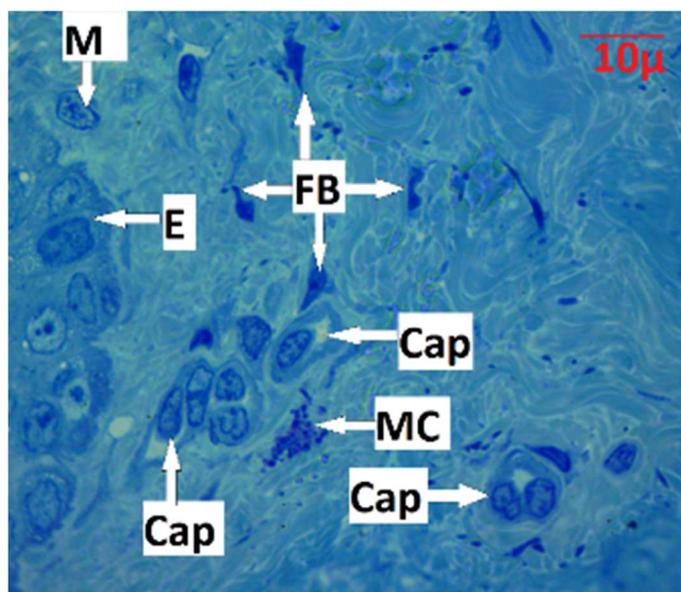


Рис.72. Сосуды микроциркуляторного русла, окруженные структурированными соединительнотканными волокнами. 3-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Окраска: толуидиновый синий. Увеличение: 1000.

Cap – капилляр, FB – фибробласт, MP – макрофаг, MC – тучная клетка, E – эпителий.

Базальная мембрана капилляров в 1-ой группе была тонкая. У эндотелиоцитов наблюдалось небольшое количество микроворсинок и микропиноцитозных пузырьков, они были окружены периваскулярным отеком (Рис.73а,б, Рис.74а,б).

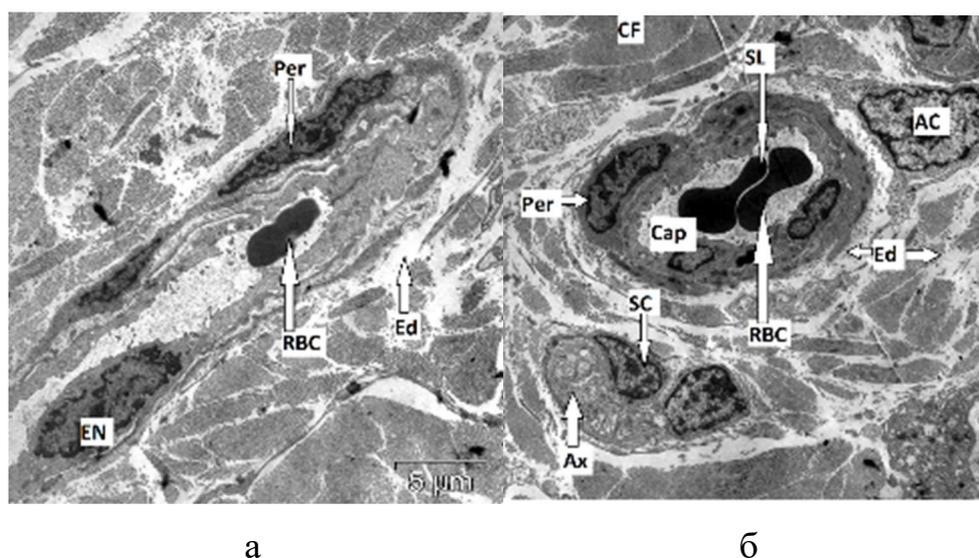


Рис.73. а - венола с периваскулярным отеком. б - капилляр со сладжем форменных элементов и периваскулярным отеком. 1-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Увеличение: 5000

Cap - капилляр, EN – эндотелиоцит, Per – перицит, AC – адвентициальная клетка, RBC – эритроцит, SC – шванновская клетка, AX – аксон, Ed – периваскулярный отек, SL – сладж, CF – соединительнотканное волокно.

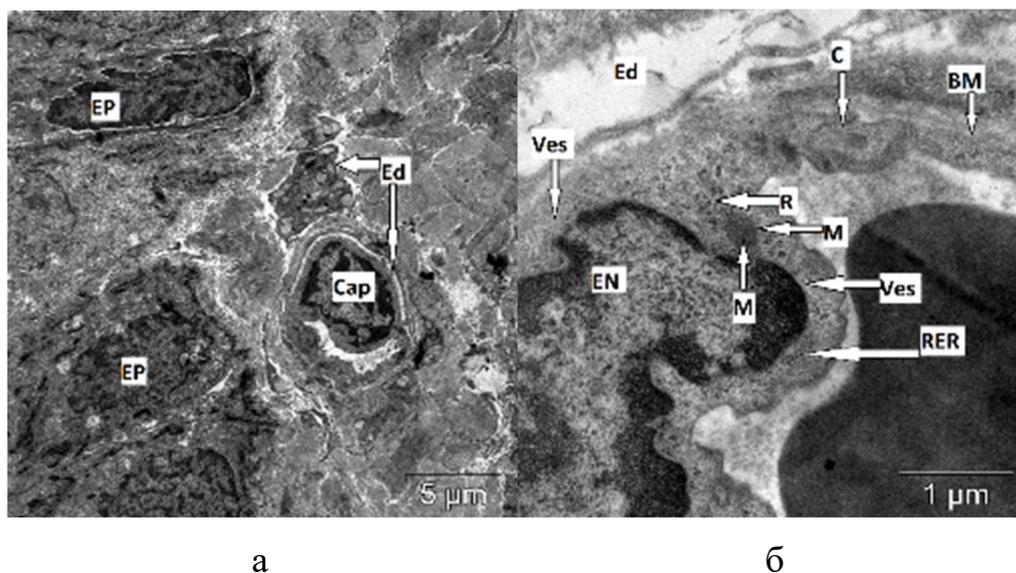


Рис.74. Капилляры в области раневого дефекта с признаками периваскулярного отека и небольшим количеством микроиноцитозных пузырьков и микроворсинок. 1-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Увеличение: а - 5000, б – 20000

Cap – капилляр, EP – клетки эпителия, Ed – периваскулярный отек, C – межклеточный контакт, BM – базальная мембрана, EN – эндотелиоцит, M – митохондрия, R – полисомы, RER – гранулярный эндоплазматический ретикулум, Ves – микроиноцитозные пузырьки.

В группах с покрытием визуализировались зрелые сформированные сосуды микроциркуляторного русла без явлений сладжа, стаза и тромбоза. Сосуды были окружены структурированными волокнами соединительной ткани, периваскулярный отек отсутствовал. Базальная мембрана была непрерывной, равномерной толщины. Органеллы были представлены в достаточном количестве, имели типичную структуру. Активно протекал трансапиллярный обмен, о чем свидетельствовало большое количество микроиноцитозных пузырьков и выростов плазматической мембраны в сторону просвета сосудов (Рис.75).

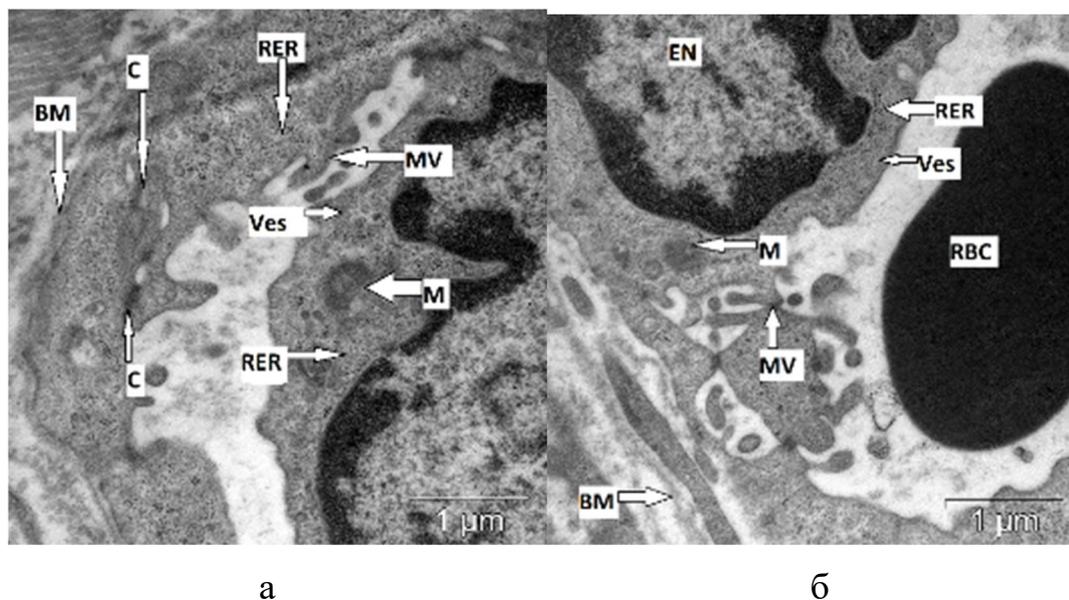
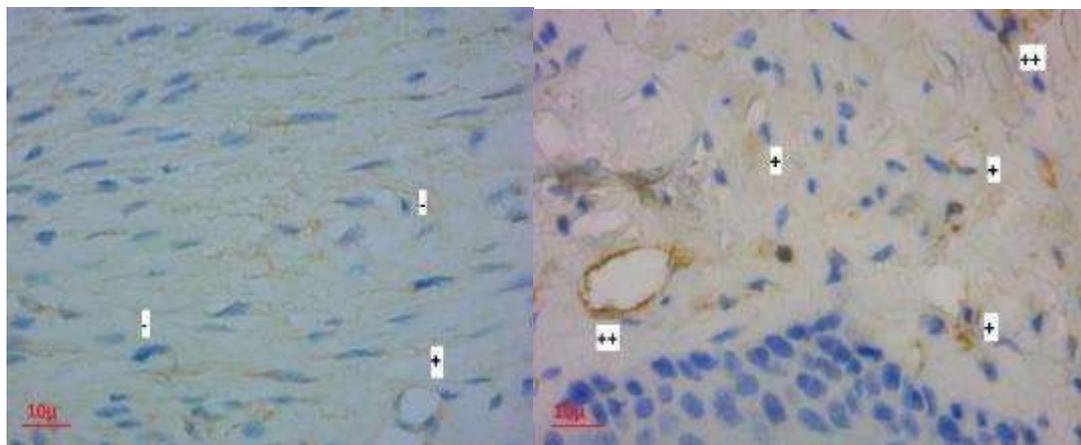


Рис.75. Капилляры с признаками высокого транскапиллярного обмена на месте раневого дефекта. а - 2-я экспериментальная группа, б – 3-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Увеличение: 20000.

EN – эндотелиоцит, *RBC* – эритроцит, *BM* – базальная мембрана, *C* – межклеточный контакт, *M* – митохондрия, *RER* – гранулярный эндоплазматический ретикулум, *MV* – выросты плазмолеммы, *Ves* – микропиноцитозные пузырьки.

Экспрессия VEGF снижалась по сравнению с 7-ми сутками во всех экспериментальных группах. Индекс H-score VEGF в 1-ой экспериментальной группе становился в 1,45 раз меньше контрольных значений ($p < 0,05$) (Рис.76а), по-прежнему наблюдалась достоверная прямая корреляция между повышенной численной плотностью нейтрофилов и данным показателем ($r = -0,3$, $p < 0,05$). Между 2-ой и 3-ей группам он достоверно не отличался ($p > 0,05$) (Рис.76б), но был в 1,6 и 2,4 раза достоверно больше, чем в 1-ой и контрольной группам ($p < 0,05$) (Таблица 9). Также в 3-ей экспериментальной группе наблюдалась обратная достоверная корреляция между численной плотностью фибробластов и H-score для

VEGF ($r=-0.5$, $p<0.05$), экспрессируемого эндотелиоцитами сосудов, присутствующих в достаточном количестве на месте раневого дефекта.



а

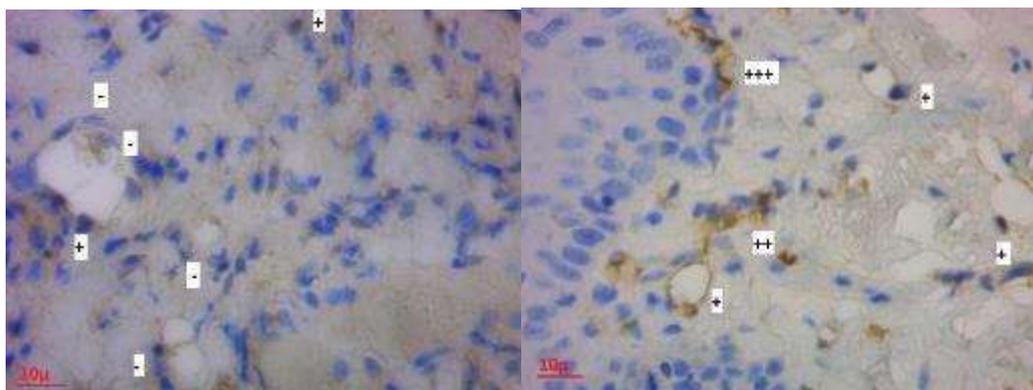
б

Рис. 76. Экспрессия VEGF в эндотелиоцитах грануляционной ткани, докрасивание ядер гематоксилином А – 1-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. В – гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования.

Увеличение: 900.

++++ - Очень сильное окрашивание, +++ - сильное окрашивание, ++ - умеренное окрашивание, + - слабое окрашивание, - - нет окрашивания.

Экспрессия CD34 достигала контрольных значений в 3-ей экспериментальной группе. Во 2-ой экспериментальной группе она была в 1,3 и 2,3 раза достоверно больше, чем в контрольной и 1-ой группах ($p<0,05$). При этом в 1-ой экспериментальной группе этот показатель был в 1,8 раз достоверно ниже, чем в интактной слизистой оболочке ($p<0,05$) (Таблица 9) (Рис77аб).



а

б

Рис.77. Экспрессия CD34 в эндотелиоцитах грануляционной ткани, докрасивание ядер гематоксилином. А – 1-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. В – гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 2-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования.

Увеличение: 900.

++++ - Очень сильное окрашивание, +++ - сильное окрашивание, ++ - умеренное окрашивание, + - слабое окрашивание, - - нет окрашивания.

В группах с покрытием все рассматриваемые количественные показатели гемодинамики достигали контрольных значений (Таблица 6, Таблица 7, Таблица 8).

В группе без покрытия из всех исследуемых количественных показателей восстанавливался диаметр артериол, венул и капилляров (Таблица 7). В то же время численная плотность неизменных артериол и капилляров в 1 мм² среза была в 1,4 и 1,3 раза достоверно меньше ($p < 0,05$), чем в группе контроля соответственно. Численная плотность неизменных артериол 1 мм² среза восстанавливалась до контрольных значений. По-прежнему встречались измененные артериолы и венулы со стазом и сдвигем форменных элементов, но их численная плотность 1 мм² среза по

сравнению с 7-ми сутками исследования достоверно уменьшалась в 2 и 1,5 раза соответственно ($p < 0,05$) (Таблица 6).

Морфометрические показатели гемодинамики значимо отличались от контрольных значений – артериоло-веноулярное взаимоотношение и индекс перикапиллярной диффузии были в 1,3 и 1,6 раз достоверно меньше соответственно, а индекс перикапиллярной диффузии в 1,6 раз достоверно больше ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля (Таблица 8).

Таким образом, при закрытии раневого дефекта полимерной пьезоэлектрической мембраной, и, как следствие, защита от травматического воздействия со стороны агрессивных факторов ротовой полости, приводило к более быстрому восстановлению микроциркуляции и гемодинамики в зоне повреждения и формированию новых сосудов.

3.2.3.2. Морфологическая характеристика нервного аппарата в зависимости от методики ведения раневого дефекта на разных этапах его заживления

Восстановление нервного аппарата в области раневого дефекта – долгий сложный процесс, который является маркером отсутствия патологических изменений в регенерирующих тканях.

Для фазы воспаления, протекающей в первые дни после травматизации не характерно формирование новых периферических нервных волокон. Поэтому на 3-и и 7-е сутки исследования в области раневого дефекта они не определялись на ультраструктурном уровне и при проведении иммуногистохимического исследования (Рис. 78).

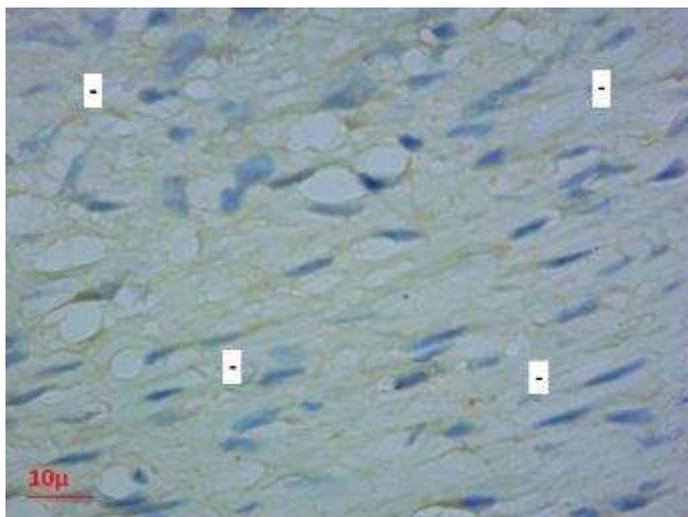


Рис.78. Отсутствие экспрессии S-100 в собственной пластинке слизистой оболочки полости рта, докрашивание ядер гематоксилином. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования.

Увеличение: 900.

- - нет окрашивания.

При этом в тканях на границе с раневым дефектом во всех экспериментальных группах определялись периферические нервы, располагающиеся недалеко от кровеносных сосудов. Они содержали в себе как миелиновые, так и безмиелиновые нервные волокна, с преимущественным преобладанием последних. В отростках нервных клеток определялись единичные отечные митохондрии с деструкцией крист. Наблюдался отек периневрального и эндоневрального пространства (Рис.79а,б).

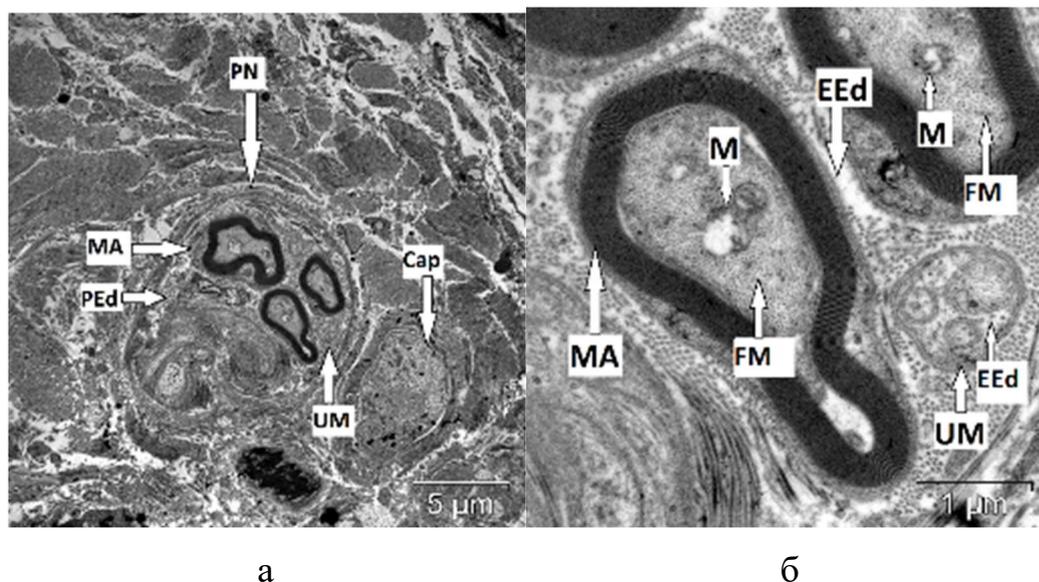


Рис.79. Периферический нерв, содержащий миелिनные и безмиелिनные волокна на периферии раневого дефекта. Гистологическая картина, характерная всех экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. Увеличение: а - 5000, б - 20000.

PN – периферический нерв, MA – миелिनное нервное волокно, UM – безмиелिनное нервное волокно, PEd – отек периневрального пространства, EEд – отек эндоневрального пространства, M – митохондрии, FM – нейрофиламенты и микротрубочки.

На 12-е сутки исследования в группах с раневым покрытием в области раневого дефекта определялись периферические нервы с безмиелинными нервными волокнами, эндоневральное пространство было отечным (Рис.80). В группе без покрытия периферические нервные волокна не визуализировались.

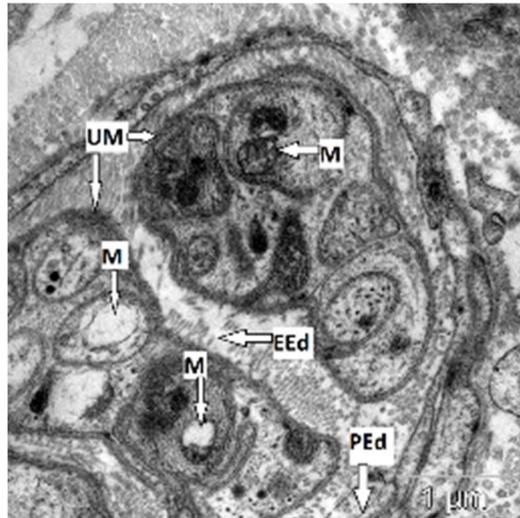


Рис.80. Периферический нерв, содержащий безмиелиновые волокна. Гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Увеличение: 20000.

UM – безмиелиновое нервное волокно, PerC – периневральная клетка, PEd – отек периневрального пространства, EEd – отек эндоневрального пространства, M – митохондрия.

Несмотря на то, что при помощи электронной микроскопии в группах с раневым покрытием обнаруживались новообразованные периферические нервные волокна, иммуногистохимическое исследование не выявило экспрессию маркера S-100 в собственной пластинке слизистой оболочки полости рта, что свидетельствовало о начальных стадиях восстановления нервного аппарата (Рис.81).

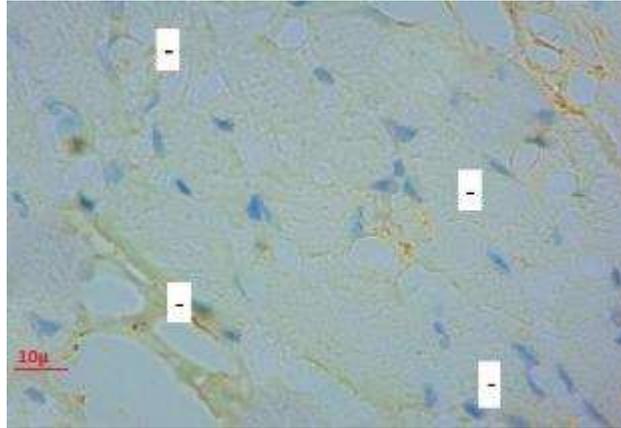


Рис.81. Отсутствие экспрессии S-100 в собственной пластинке слизистой оболочки полости рта, докрасивание ядер гематоксилином. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. 1-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования.

Увеличение: 900.

- нет окрашивания.

В тканях на границе с раневым дефектом в группе без покрытия наблюдались периферические нервы с периневральным и эндоневральным отеком. В осевых цилиндрах содержались отечные митохондрии с деструкцией крист (Рис.82).

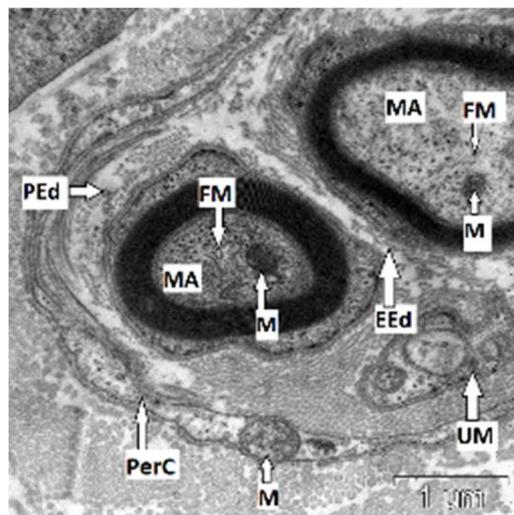


Рис.82. Периферический нерв с периневральным и эндоневральным отеком на периферии раневого дефекта. 1-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования. Увеличение: 20000.

МА – миелиновое нервное волокно, УМ – безмиелиновое нервное волокно, PerC – периневральная клетка, PEd – отек периневрального пространства, EEd – отек эндоневрального пространства, М – митохондрия, FM –нейрофиламенты и микротрубочки.

В группах с покрытием подобные патологические изменения отсутствовали – митохондрии не имели признаков отека и деструкции крист, периневральный и эндоневральный отек отсутствовали (Рис.83).

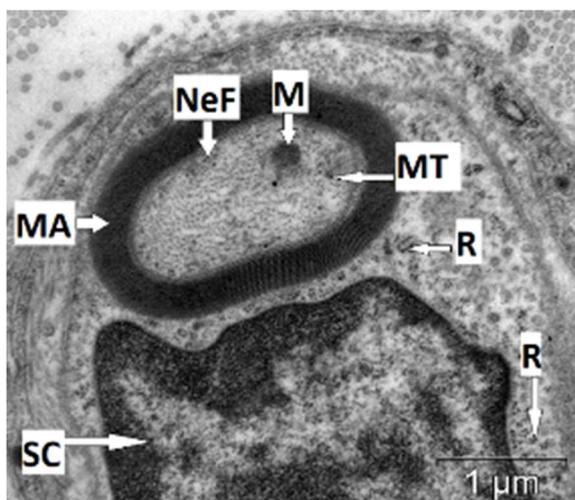


Рис.83. Периферический нерв, содержащий миелиновые волокна без признаков периневрального и эндоневрального отека на периферии раневого дефекта. Гистологическая картина, характерная для 2-ой и 3-е экспериментальных групп. 3-я экспериментальная группа. Увеличение: 20000.

МА – миелиновое волокно, SC – шванновская клетка, М – митохондрия, R – полисомы, NeF – нейрофиламент, MT – микротрубочка.

При использовании раневого покрытия наблюдалось формирование периферических нервных волокон на более ранних сроках течения раневого покрытия, что доказывают данные электронной микроскопии уже на 12-е сутки исследования. Также защита раневого дефекта посредством полимерных пьезоэлектрических мембран способствовало снижению риска развития патологических изменений ультраструктур как самих нервных волокон, так и клеток глии на периферии.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Лечение раневых дефектов слизистой оболочки полости рта – распространенная проблема, которая часто встречается в стоматологической практике. При обширных оперативных вмешательствах, возможных при хирургическом удалении новообразований, вестибулопластике, подготовке к имплантации происходит формирование больших по площади раневых дефектов. В случае, если края раны находятся далеко друг от друга заживление происходит посредством вторичного натяжения, результатом которого является формирование рубца (Reinke J. M. et., 2018, Wang P. H. et al., 2018).

Ситуацию усугубляет тот факт, что анатомо-топографические особенности ротовой полости, а также физиологические процессы, протекающие в ней, могут негативным образом влиять на заживление незащищенного раневого дефекта, который подвергается постоянному повторному травматическому воздействию со стороны термических, механических, химических агрессивных факторов (Brand H. S. et al., 2013, Hakkinen L. et al., 2015, Politis C., 2016). Кроме того, в ротовой полости представлен разнообразный по своему составу комплекс микроорганизмов, который обсеменяет открытый раневой дефект, что также негативным образом влияет на его заживление (Smith P. et al., 2018).

Мягкие ткани слизистой оболочки полости рта, измененные в результате рубцовой деформации, становятся малоподвижными и существенно теряют в своем объеме, что, как следствие, может приводить к усложнению дальнейшего хирургического, ортопедического и ортодонтического лечения.

В ходе настоящего исследования была подтверждена эффективность использования нетканых пьезоэлектрических полимерных мембран, разработанных в лаборатории гибридных биоматериалов НИ ТПУ, на

основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом при раневых дефектах слизистой оболочки полости рта.

Этапы заживления раневого дефекта слизистой оболочки полости рта, наблюдаемые в ходе исследования у крыс линии Wistar, в целом, соответствовали общепринятым представлениям о течении раневого процесса. Так, первая стадия, воспаления, наблюдалась на 3-и сутки, вторая, регенерации, на 7-е сутки, и третья, реорганизации рубца, на 12-е сутки исследования (Des Jardins-Park H. E. et al., 2019).

На 3-и сутки исследования во всех экспериментальных группах по краям раны наблюдались некротические ткани, обсемененные микроорганизмами. Некроз тканей, согласно уже проведенным ранее исследованиям Krishnan и Chen, был обусловлен местным ацидозом в результате анаэробного гликолиза, происходящего в области ранения. В этих условиях важную роль играла стерильность раны (Krishnan K. et al., 2017). Так, во 2-ой и 3-ей группах при защите раны от микроорганизмов за счет перекрытия полимерной мембраной, некротический субстрат подвергался рассасыванию, а рана заживала преимущественно первичным натяжением с незначительным образованием рубцовой ткани в дальнейшем. В то время, как в 1-ой группе в условиях отсутствия стерильности раны формировался кровяной сгусток, прикрытый струпом (Krishnan K. et al., 2017). Заживление раны происходило вторичным натяжением с образованием рубца и макроскопически сопровождалось снижением объема мягких тканей на 12-е сутки исследования, что не наблюдалось в группах с покрытием.

1-й этап заживления ран протекал с преобладанием воспалительной реакции первые трое суток. Она была направлена на ограничение дефекта, содержащего некротические ткани, микроорганизмы и элементы первичной контаминации от здоровых тканей, удаление этих патологических продуктов, ликвидацию последствий повреждения, а также активацию

цитокинов и факторов роста (Avishai, E. et al., 2017). При этом происходили сложные межклеточные взаимодействия, механизм которых до конца не изучен, но они были направлены на восстановление целостности ткани и защиту ее от агрессивных воздействий со стороны ротовой полости (Быков В.Л. и др., 2019). В этом процессе участвовали клетки соединительной ткани: фибробласты, макрофаги, тучные клетки, агранулоциты и гранулоциты. Выраженность воспалительной инфильтрации в ране нарастала с увеличением срока течения раневого процесса и по мере приближения к раневому каналу, что наблюдалось в аналогичных исследованиях, проведенных ранее. (Rodrigues M. et al., 2019, Xiao T. et al., 2020).

На этом этапе основную роль в воспалении играли нейтрофилы, численная плотность которых достоверно увеличивалась во всех экспериментальных группах, а их фагоцитарная активность, по данным электронной микроскопии, повышалась. В интактной слизистой оболочке они практически не встречались. Основная функция нейтрофилов, по мнению В.Л.Быкова, заключалась в очищении раневого дефекта от тканевого дендрита и микроорганизмов и секреции биологически активных веществ, необходимых для миграции в рану других клеточных элементов (Быков В.Л. и др., 2019), что на ультрамикроскопическом уровне выражалось наличием развитых органелл синтеза в цитоплазме нейтрофилов.

Согласно современным представлениям о воспалительном процессе нейтрофильная инфильтрация должна заместиться на макрофагальную (Быков В.Л. и др., 2019). При использовании полимерной мембраны, особенно в группе с медным напылением, наблюдалась более активная смена нейтрофильной инфильтрации на макрофагальную, что могло свидетельствовать о более быстром стихании фазы воспаления. Также во 2-ой и 3-ей группах макрофаги имели ультраструктурные признаки,

указывающие на высокий уровень синтетических процессов, что по данным Serra было связано с образованием биологически активных веществ, координирующих воспалительные и регенераторные процессы, благодаря влиянию на пролиферацию фибробластов. Кроме того, они сами могли принимать участие в синтезе внеклеточного матрикса. (Serra M.B. et al., 2017, Kotwal G.J., et al., 2018).

Важную роль в реализации процесса воспаления играли тучные клетки, которые, вероятно, участвовали в ремоделировании межклеточного матрикса и регуляции тонуса сосудистой стенки, что было необходимым для миграции других клеток в очаг воспаления, благодаря выделению биологически активных веществ в результате дегрануляции (Vidal M.T. et al., 2013, Виноградов А.Б. и др., 2004).

В связи с дегрануляцией тучные клетки не выявлялись на уровне световой микроскопии, что сопровождалось достоверным снижением их численной плотности во всех экспериментальных группах. Не дегранулировавшие тучные клетки обнаруживались преимущественно вблизи полнокровных сосудов с периваскулярным отеком.

Увеличение численной плотности плазмочитов, лимфоцитов и эозинофилов во всех опытных группах, по-видимому, было связано с тем, что в результате отека нарушалась тканевая обмен и кислотно-щелочной баланс, что приводило к активации этих клеточных популяций в ране. По данным уже имеющихся исследований, они участвовали в уничтожении микроорганизмов, и за счет выделения биологически активных веществ привлекали в рану другие клетки воспалительного инфильтрата (Codan M.E. et al., 2020, Wang X. et al., 2019, Sîrbulescu R.F., et al., 2017).

Деятельность клеток – резидентов, таких как тканевые макрофаги, тучные клетки, пришлые клетки, присутствующих в интактной слизистой оболочке, обуславливала сосудистую реакцию в области ранения. В условиях нарушения целостности тканей они выделяли биологически

активные вещества, такие как гистамин, гистидин и АТФ, которые вызывали расширение сосудов микроциркуляторного русла и увеличение проницаемости их стенок. Это, в свою очередь, становилось причиной отека окружающих мягких тканей и способствовало выходу из сосудистого русла для осуществления иммунных реакций в зоне ранения клеток лимфогистиоцитарной инфильтрации, для которых эти биологически активные вещества являлись хемоаттрактантами (Rodrigues M. et al., 2019).

Rousselle и соавторы утверждали, что последовательность сосудистых реакций в ране имеет свои закономерности и зависит от стадии раневого процесса (Rousselle P. et al., 2019, Клоц М. et al., 2018), что и продемонстрировало наше исследование.

В фазу воспаления наблюдалась ярко выраженная сосудистая реакция по периферии от раны, которая проявлялась в резком увеличении диаметра венул и капилляров и сужении просвета артериол. Отражением этого процесса являлось изменение такого показателя как артериоло-венулярное взаимоотношение, которое уменьшалось во всех экспериментальных группах. Также изменялись индекс перикапиллярной диффузии и индекс Керногана. Уменьшение первого показателя, отражающего площадь ткани, которую кровоснабжает один капилляр, во всех экспериментальных группах говорило об ишемии слизистой оболочки полости рта по периферии от раневого дефекта. Значимое повышение второго показателя во всех экспериментальных группах, которое наблюдается или при увеличении толщины стенки артериол, или при сужении их просвета характеризовало нарушение их пропускной способности. Изменение всех вышеперечисленных показателей, согласно представлениям о течении раневого процесса, способствовало венозному застою и развитию отека тканей, в результате чего раневой дефект ограждался от здоровых тканей, не позволяя продуктам распада клеток и бактериям распространяться по организму. Кроме того, отек содействовал сближению краев раны, что

способствовало заживлению раны посредством первичного натяжения (Alim M.A. et al., 2020).

Также, в этот период на периферии раневого дефекта во всех экспериментальных группах наблюдалось большое количество измененных сосудов с тромбозом, сладжем форменных элементов и периваскулярным отеком. На ультраструктурном уровне в клетках эндотелия определялось расширение цистерн эндоплазматического ретикулума и комплекса Гольджи и набухание митохондрий.

Подобные изменения, вероятно, происходили из-за активизации гидролитических ферментов лизосом, снижения окислительных процессов и накопления продуктов обмена, в результате чего в клетке задерживалась интрацеллюлярная вода (Kelly E. et al., 2014). О снижении метаболизма, транскапиллярного обмена и синтетических процессов в клетках эндотелия свидетельствовали уменьшение количества микропиноцитозных пузырьков и микроворсинок, преобладание гетерохроматина над эухроматином в ядре и обеднение клеток органеллами. В дополнение наблюдалось нарушение межклеточных контактов, которое, по мнению Kelly, могло происходить на фоне действия проангиогенных факторов уже существующих сосудов для запуска процесса неоангиогенеза (Kelly E. et al., 2014).

Помимо воспалительной реакции на 3-и сутки исследования наблюдалось формирование молодой грануляционной ткани с большим количеством новообразованных сосудов. Ее развитие, как в своем исследовании указывают Velnar и Bailey, способствовало отторжению мертвого субстрата, являлось барьером для предотвращения распространения микроорганизмов, а также становилось основой для формирования молодой соединительной ткани на последующих стадиях регенерации раны (Velnar T. et al., 2009). В подтверждение этому на ультраструктурном уровне выявлялись микроорганизмы, располагающиеся на поверхности раневого дефекта, и отдельные пучки

соединительнотканых волокон вблизи фибробластов и новообразованных сосудов.

Базисным механизмом заживления раны, по мнению Wehrhan, являлся неангиогенез (Wehrhan F. et al., 2009).

Во всех экспериментальных группах наблюдалось активное образование капилляров в грануляционной ткани, удельная площадь которых занимала практически половину от общей площади зоны заживления. У новообразованных сосудов визуализировалась тонкая стенка, их просветы были расширены. На ультраструктурном уровне определялась прерывистая тонкая базальная мембрана. В группах с покрытием плазмолемма эндотелия капилляров образовывала многочисленные микроворсинки, в области ее люминального края располагались микропиноцитозные пузырьки, что свидетельствовало о высоком уровне транскапиллярного обмена. В 1-ой экспериментальной группе микроворсинки визуализировались редко, количество микропиноцитозных пузырьков было незначительным.

Неоангиогенез и воспалительная реакция способствовали высвобождению эндотелием и клетками воспалительного инфильтрата проангиогенных молекул - фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и хемокинов, необходимых для обеспечения роста капилляров. Ранее было отмечено, что присутствие VEGF в области регенерирующего раневого дефекта также поддерживало воспалительный ответ (Lucas T. et al, 2010) и увеличивало проницаемость сосудов, что дополнительно способствовало отеку окружающих тканей (Пронина Е.А. и др., 2019). VEGF являлся, по мнению Zhao, основным проангиогенным фактором, присутствующим и в интактной слизистой оболочке, а его экспрессия должна была значительно повышаться при заживлении раневого дефекта (Zhao N. et al., 2019, Xu X., et al., 2018). В нашем исследовании экспрессия VEGF увеличивалась во всех экспериментальных группах, особенно с раневым покрытием, что

указывало на более интенсивное сосудообразование при отсутствии воздействий со стороны агрессивных факторов ротовой полости.

В качестве маркера, отражающего созревание кровеносных и лимфатических сосудов, используется CD34, чья биологическая функция изучена еще недостаточно, но повышение его экспрессии связывают с созреванием сосудов (Nielsen J. S. et al., 2008, Smane-Filipova L. et al, 2016, Vasuri F. et al., 2016). Экспрессия этого маркера в группах с покрытием увеличивалась по сравнению с контрольными значениями, а в группе без покрытия уменьшалась, что могло свидетельствовать о более быстром созревании сосудов во 2-ой и 3-ей группах (Vasuri F. et al., 2016). Также наблюдалась корреляция между численной плотностью нейтрофилов и экспрессией CD34, так в условиях повышенного воспалительного ответа, реализуемого нейтрофилами, снижалась экспрессия CD34 (Smane-Filipova L. et al, 2016).

Также важным аспектом успешного ранозаживления являлась эпителизация раны. Эпителиальная ткань являлась наиболее быстро делящейся в организме, что имело решающее значение для заживления, так как эпителий был необходим для обеспечения барьера между тканями и внешней средой (Pereira D. et al., 2021).

Процесс эпителизации запускался молекулами, по данным Belm и соавторов, которые выделялись самими эпителиоцитами, поврежденными в ходе ранения, а также клетками лимфогистиоцитарной инфильтрации (Behm V. et al., 2012). На первом этапе эпителизации основная задача состояла в полном перекрытии раневого дефекта для защиты тканей от агрессивных факторов ротовой полости (Andersen L., 1980). Для этого эпителиоциты претерпевали ряд изменений на ультраструктурном уровне. Клетки базального слоя увеличивались в размерах, уплощались, теряли апикально-базальную полярность, десмосомы между клетками и полудесмосомы с базальной мембраной деградировали. Благодаря этому

могла происходить миграция эпителиоцитов от краев к центру раны (Koivisto L. et al., 2012). Однако сохранялись единичные десмосомальные контакты. Подобный феномен наблюдал Rørth, который объяснил их наличие необходимостью скоординированной коллективной миграции эпителия (Rørth P. et al., 2009).

Высокая пролиферативная активность клеток базального слоя наблюдалась только в группах с покрытием, в которых раневой дефект был полностью перекрыт 3-5 слоями эпителия. В группе без раневого покрытия, где эпителий наблюдался только по краям дефекта, мы наблюдали отсутствие ультраструктурных признаков высокой пролиферативной активности. Что объясняется в исследовании Wehrhan и Schultze-Mosgau, которые связывали отсутствие признаков высокой пролиферативной активности у клеток базального слоя с тем, что мигрирующие клетки не могут делиться до момента полного перекрытия раневого дефекта слоем эпителия из-за снижения содержания циклинов G1/S-фаз и усиления активности циклинзависимой киназы (Wehrhan F. et al., 2009).

Вслед за базальными клетками к центру дефекта уплотняясь начинали перемещаться клетки шиповатого слоя. В группах с раневым покрытием создавались более благоприятные условия для первичного закрытия раневого дефекта эпителием, благодаря этому во 2-ой и 3-ей группах наблюдалось полное перекрытие раневого дефекта 3-4 слоями эпителия в отличие от 1-ой группы, где новообразованный эпителий наблюдался только на периферии раневого дефекта.

На 7-е сутки исследования клеточный состав инфильтрата сохранялся. Ведущая роль в воспалительном процессе переходила к макрофагам, которые становились доминирующей популяцией по сравнению с нейтрофилами, и их численная плотность увеличивалась во всех группах.

Это было связано с тем, что помимо иммунной функции, включающей фагоцитоз погибших нейтрофилов и микроорганизмов (Rousselle P. et al.,

2019), макрофаги влияли на пролиферацию фибробластов, способствуя секреции цитокинов и факторов роста, и играли важную роль в развитии соединительной ткани (Kloc M, et al., 2019, Smigiel K.S. et al., 2018).

Во 2-ой и 3-ей экспериментальных группах выраженность воспалительного процесса стихала в связи с гибелью нейтрофилов и, как следствие, уменьшением их численной плотности. В 1-ой группе по-прежнему наблюдалась обширная нейтрофильная инфильтрация, которая к тому же сопровождалась увеличением численной плотности макрофагов, что могло говорить о сохранении активного воспалительного ответа. Чрезмерная воспалительная реакция на этом этапе в дальнейшем станет, основываясь на исследовании Wang, причиной выраженного фиброза на месте раневого дефекта, признаки которого наблюдались нами в 1-ой группе на 12-е сутки исследования (Wang, H. et al., 2015). Также наблюдалась прямая корреляция между повышенной численной плотностью нейтрофилов и снижением экспрессии VEGF в 1-ой группе, что также в дальнейшем станет причиной развития фиброза в условиях недостаточного кровоснабжения (Pardali E. et al., 2010).

На этом этапе наблюдалось увеличение численной плотности тучных клеток. Их миграции в зону дефекта, вероятно, способствовали пьезоэлектрические свойства защитной мембраны, так как клетки этой популяции в большом количестве присутствовали во 2-й и 3-й опытных группах по сравнению с группой без покрытия. Появление тучных клеток в месте раневого дефекта в эту фазу, имело важное значение для формирования рыхлой волокнистой соединительной ткани (Alim M.A. et al., 2020). Секретируя гистамин, гиалуроновую кислоту, гепарин, факторы роста, цитокины и протеазы, тучные клетки участвовали в процессах ремоделирования межклеточного матрикса, посредством стимуляции пролиферации фибробластов (Бирина В. В. и др., 2019) и синтеза коллагена,

а также координировали процесс дифференцировки фибробластов в миофибробласты (Mangia A. et al., 2011).

На 7-ой день исследования доминирующим процессом становилась пролиферация, основную роль в которой играли фибробласты, отвечавшие за синтез коллагена и сокращение площади раны (Jiang, D. et al., 2020). В группах, где для защиты раневого дефекта использовали полимерные мембраны, численная плотность фибробластов увеличилась по сравнению с группой с традиционным методом лечения, где формирование рыхлой волокнистой соединительной ткани, вероятно, нарушалось из-за постоянного контакта с химическими и механическими раздражителями. Фибробласты на этом этапе, исходя из исследования Rognoti, секретировали экстрацеллюлярный матрикс, заменяющий матрикс фибрина (Rognoni, E. et al., 2018), в связи с чем, помимо повышения их численной плотности в зоне раневого дефекта, наблюдалось усиление их синтетической активности, что обнаруживалось на ультраструктурном уровне во 2-ой и 3-ей экспериментальных группах. В 1-ой группе численная плотность фибробластов была значимо меньше, чем во 2-ой и 3-ей группах, кроме того по данным электронной микроскопии, в основном, наблюдались юные фибробласты с низкой синтетической активностью. Благодаря наличию в области раневого дефекта большого количества синтетически активных фибробластов в группах с покрытием наблюдалось значимое увеличение удельной площади рыхлой волокнистой соединительной ткани по сравнению с 1-ой экспериментальной группой.

Также наблюдались изменения в показателях микроциркуляторного русла. В 3-ей группе достигал контрольных значений диаметр венул, артериол и капилляров, на фоне этого восстанавливались артериоло-венулярное взаимоотношение и индекс Керногана. В обеих группах с покрытием снижалась степень выраженности периваскулярного отека, стенки большинства сосудов приобретали толщину, соответствующую

контрольным значениям. Измененные сосуды с тромбозом и сладжем визуализировались только в отдельных полях зрения. Благодаря этому степень ишемии ткани и выраженность ацидоза снижались (Бао Р. et al., 2008). В группе без покрытия диаметр капилляров, венул и артериол по-прежнему был значимо больше контрольных значений, как и морфометрические показатели гемодинамики – артериоло-венулярное взаимоотношение, индекс Керногана и индекс перикапиллярной диффузии. Во многих полях зрения встречались измененные сосуды микроциркуляторного русла с тромбозом, сладжем и полнокровием.

Кроме того, для этой стадии было характерно созревание новообразованных сосудов (Shaw T. J. et al., 2009). На 7-е сутки исследования удельная площадь новообразованных сосудов уменьшалась во всех экспериментальных группах, что было следствием, с одной стороны, развития рыхлой волокнистой соединительной ткани на месте грануляционной, а с другой стороны, могло быть связано с дальнейшей облитерацией сосудов в связи развитием рубцовой ткани на более позднем этапе регенерации раневого дефекта. Такую корреляцию отмечали в своем исследовании Ху и Нгуанг (Ху Х. et al., 2020). Благодаря хорошей васкуляризации, в группах с покрытием степень развития рубцовой ткани в дальнейшем будет менее выражена, чем в группе без покрытия. Этот процесс также отражало достоверное снижение экспрессии VEGF и CD 34 для 1-ой группы по сравнению с группами с покрытием, что являлось предпосылкой к дальнейшему недостатку кровоснабжения в области раневого дефекта, как это наблюдалось в исследованиях Бао и Кодра (Бао Р. et al., 2009).

Вблизи кровеносных сосудов по краям от раневого дефекта обнаруживались периферические нервы с периневральным и эндоневральным отеком.

Для стадии пролиферации были характерны дифференцировка клеток эпителия и утолщение его слоев. На ультраструктурном уровне восстанавливались апикально-базальная полярность базального слоя, десмосомальные контакты между клетками и полудесмосомы с базальной мембраной. Также обнаруживались признаки нарастающей пролиферации. В 1-ой группе наблюдалось полное закрытие раневого дефекта эпителием, во 2-ой и 3-ей группах количество слоев эпителия становилось больше, клетки в нем были более дифференцированными. Во всех экспериментальных группах выявлялись патологические изменения в виде акантоза и акантолиза, что морфологически характеризовалось наличием тканевого детрита в межклеточном пространстве и утолщением шиповатого слоя. Эти патологические признаки были больше выражены в группе без покрытия.

Следующим этапом регенерации раны, наступавшим на 12-е сутки, была рубцовая реорганизация, где основное значение имело взаимодействие тучных клеток и фибробластов, по мнению Ud-Din и др. При повышенном содержании первых наблюдалось выраженное формирование фиброзной ткани и келоидных рубцов (Ud-Din S. et al., 2020), которое мы наблюдали в группе без защиты раневого дефекта. В 1-ой экспериментальной группе наблюдалось сохранение инфильтрации макрофагами, что было плохим прогностическим признаком, на основании исследования Hu и Gc , поскольку это являлось предпосылкой к развитию рубцовых изменений (Hu X. et al., 2020). При этом, в целом, раневое ложе утрачивало большую часть клеточных элементов. В группах с покрытием численная плотность почти всех клеточных элементов достигала контрольных значений, за исключением численной плотности лимфоцитов. Они, вероятно, принимали участие в перестройке рубца, высвобождая биологически активные вещества, влияющие на прекращение пролиферации фибробластов

(Carlavan I, et al., 2018). Также во 2-ой экспериментальной группе численная плотность нейтрофилов не достигала контрольных значений.

В группах с покрытием, в отличие от 1-ой экспериментальной группы, преобладала удельная площадь рыхлой волокнистой соединительной ткани над рубцовой, а также наблюдались преимущественно синтетически не активные фиброциты.

На 12-е сутки происходило уменьшение количества сосудов микроциркуляторного русла во всех экспериментальных группах. Уменьшение количества новообразованных сосудов микроциркуляторного русла связывают с их регрессией в результате избирательного апоптоза на фоне усиления выработки антиангиогенных и снижения проангиогенных факторов, таких как VEGF и CD34. (Пронина, Е. А. и др., 2019). В подтверждение этому мы наблюдали, что в 1-ой экспериментальной группе экспрессия VEGF и CD34 была значимо ниже, чем в интактной слизистой оболочке, это объясняло уменьшение численной плотности сосудов микроциркуляторного русла ниже показателей контроля. Это свидетельствовало об ухудшении кровоснабжения ткани на месте раневого дефекта, что по мнению Pardali, является одной из основных причин рубцовой деформации (Pardali E. et al., 2010). В группах с покрытием экспрессия маркеров сосудообразования была выше контрольных значений, а численная плотность артериол, венул и капилляров была как в интактной слизистой оболочке. В 3-ей группе наблюдалась обратная корреляция между численной плотностью фибробластов и экспрессией VEGF, что, по мнению Zhao и др., свидетельствовало о том, что при повышении численной плотности синтетически активных фибробластов на этой стадии ведет к образованию маловаскуляризованной соединительной ткани (Zhao N. et al., 2019).

Во 2-ой и 3-ей группах практически все показатели гемодинамики достигали контрольных значений – диаметр и толщина сосудистой стенки

восстанавливались, измененные сосуды не визуализировались, ткань была богато васкуляризирована. В группе без раневого покрытия индекс Керногана, индекс перикапиллярной диффузии, артериоло-венулярное взаимоотношение не достигали контрольных значений, что говорило об ишемии тканей, а численная плотность сосудов уменьшалась по сравнению с контрольной группой из-за развития рубцовой ткани. Это, по всей видимости, было связано с постоянной травматизацией не защищенной раневой поверхности (Ud-Din S. et al., 2020). На ультраструктурном уровне у эндотелиоцитов 1-ой группы по-прежнему сохранялись признаки нарушения транскапиллярного обмена.

На 12-е сутки, по данным электронной микроскопии, в группах с раневым покрытием визуализировались периферические нервы, содержащие безмиелиновые нервные волокна, в группе без него они не определялись. Также в 1-ой группе по краям от раневого дефекта обнаруживались периферические нервы с признаками периневрального и эндоневрального отека, в аксонах которых визуализировались митохондрии с деструкцией крист.

В ходе фазы ремоделирования в группах с раневым покрытием восстанавливались толщина эпителиального пласта, количество его слоев, клетки эпителия становились более дифференцированными, определялись хорошо выраженные межклеточные десмосомальные контакты и полудесмосомы с базальной мембраной, рельеф собственной пластинки слизистой становился типичным в виде сосочков.

Полное восстановление толщины и количества слоев эпителия в группах с покрытием происходило благодаря защите его от микроорганизмов. De Rusk и Vanlancker наблюдали, что при нарушении целостности эпителиального пласта, в случае открытой раны, микроорганизмы проникали на дно дефекта, их экзотоксины воздействовали на рану как изнутри, так и снаружи, вызывая апоптоз

эпителиоцитов и нарушая их пролиферацию и миграцию, что было связано с феноменом коллективной регуляции экспрессии генов бактерий в биопленке, который повышал их резистентность и способность к колонизации (De Ruyck T. et al., 2015). Также продукты метаболизма микроорганизмов вызывали, по данным Smith и др., в эпителиоцитах усиленную выработку провоспалительных медиаторов через толл-подобные рецепторы (Smith P. et al., 2018). В результате этого нами наблюдалось истончение эпителиального пласта и снижения количества его слоев в группе без покрытия, а также сохранение таких патологических изменений как акантоз и акантолиз.

Таким образом, в группах с покрытием почти все рассматриваемые показатели, характеризующие восстановление слизистой оболочки полости рта после ранения, достигали контрольных значений в отличии от группы, где использовалась стандартная методика ведения раневого дефекта, где он оставлялся открытым.

При этом, при использовании полимерной пьезоэлектрической мембраны, модифицированной медью, происходило более выраженное снижение воспалительной реакции. Отражением этого процесса была более быстрая смена нейтрофильной инфильтрации на макрофагальную, а также восстановление показателей микроциркуляции, таких как численная плотность измененных артериол и венул, индекс перикапиллярной диффузии и артериоло-венулярное взаимоотношение, уже на 7-е сутки исследования. Также мы наблюдали высокую экспрессию CD34 на 3-и и 7-е сутки исследования, что говорило о более быстром созревании новообразованных сосудов в области раневого дефекта. По данным Alim M.A. et al [2020] в условиях улучшения гемодинамики, выраженность ацидоза, вызванного венозным застоем и отеком тканей, уменьшается, что способствует миграции синтетически активных клеток фибробластического ряда в зону дефекта. В совокупности эти процессы способствовали

образованию рыхлой волокнистой соединительной ткани, удельная площадь которой в группе с медным напылением была достоверно больше, чем в 1-ой и во 2-ой группах. В то же время на 12-е сутки в группе с медным покрытием наблюдалась наименьшая удельная площадь плотной волокнистой соединительной ткани.

Кроме того, уже на 7-е сутки исследование наблюдалось более активное утолщение слоев эпителия, его клетки становились более дифференцированными.

Таким образом, использование полимерной пьезоэлектрической мембраны, модифицированной медью, показывает более эффективные результаты при восстановлении раневых дефектов слизистой оболочки полости рта.

На основании вышеизложенного нам представляется следующая схема патоморфогенеза раневого процесса: в условиях защиты раневого дефекта от травмирующих факторов и микробной контаминации сокращалась длительность воспалительной фазы, и происходил более быстрый переход в фазу регенерации, что выражалось повышением численной плотности макрофагов, реализующих процесс фагоцитоза, что наряду с полным перекрытием области ранения эпителиальным пластом способствовало отторжению мертвого субстрата и очищению зоны ранения. В таких благоприятных условиях, а также благодаря пьезоэлектрическим свойствам мембраны (Volbasov et al., 2020) наблюдалось значимое увеличение численной плотности фибробластов, которые в группах с покрытием были окружены отдельными пучками соединительнотканых волокон, в отличие от 1-ой группы, где визуализировалась только грануляционная ткань.

В группе без раневого покрытия в условиях травматизации и повторной микробной контаминации преобладала нейтрофильная инфильтрация, которая постепенно замещалась на макрофагальную только

на 7-е сутки исследования, что увеличивало продолжительность стадии воспаления.

Во всех экспериментальных группах снижалась численная плотность тучных клеток, которые не визуализировались за счет дегрануляции, что, по данным Vidal (Vidal M.T. et al., 2013), было причиной сосудистой реакции на периферии от раневого дефекта в виде венозного застоя и развития отека, которые также способствовали отторжению мертвого субстрата. В условиях ацидоза, по данным Zhao (Zhao N. et al., 2019) увеличивалась экспрессия VEGF, особенно в группах с покрытием, что отражало активный неоангиогенез. В группах с раневым покрытием определялось усиление экспрессии CD34, маркера созревания сосудов (по данным Smane-Filipova L. et al., 2016) что свидетельствовало о более быстром переходе на стадию регенерации. В группе без раневого покрытия экспрессия данного маркера была значимо ниже, чем в контрольной группе.

На 7-е сутки в группах с покрытием наблюдались остаточные воспалительные явления – численная плотность макрофагов и нейтрофилов снижалась, на фоне восстановления показателей гемодинамики уменьшалась выраженность ацидоза (по данным Zhao N. et al., 2019). В этих условиях доминирующей становилась стадия регенерации, характеризующаяся увеличением численной плотности фибробластов, относительной площади рыхлой волокнистой соединительной ткани и созреванием сосудов. Последний процесс происходит в условиях постепенного снижения экспрессии VEGF и увеличения экспрессии CD34.

В группах без покрытия наблюдалась повышение численной плотности макрофагов и нейтрофилов, что свидетельствовало о более длительном течении стадии воспаления. В этих условиях сохранялся ацидоз, который влиял на активность фибробластов, чья численная плотность была ниже, чем в группах с покрытием. Более выраженное

снижение экспрессии VEGF в 1-ой группе приводило к нарушению неоангиогенеза и усиленной облитерации сосудов.

На 12-е сутки исследования в группах с покрытием численная плотность фибробластов, макрофагов, нейтрофилов и тучных клеток, показатели гемодинамики, а также экспрессия VEGF и CD34 достигали контрольных значений. Как итог мы наблюдали преимущественное образование рыхлой волокнистой соединительной ткани, что не приводило к дальнейшему развитию рубцовой деформации.

В группе без покрытия сохранялось увеличение численной плотности тучных клеток, макрофагов и нейтрофилов, которые на более поздних стадиях регенерации раны, по данным Alim (Alim M.A. et al., 2020) отвечали за выделение биологически активных веществ, влияющих на функционирование фибробластов и образование плотной волокнистой соединительной ткани. Этот факт и недостаточность кровоснабжения, отражением которой являлось уменьшение экспрессии VEGF и CD34 ниже контрольных значений, свидетельствовали о рубцовой деформации как результате регенерации раневого дефекта.

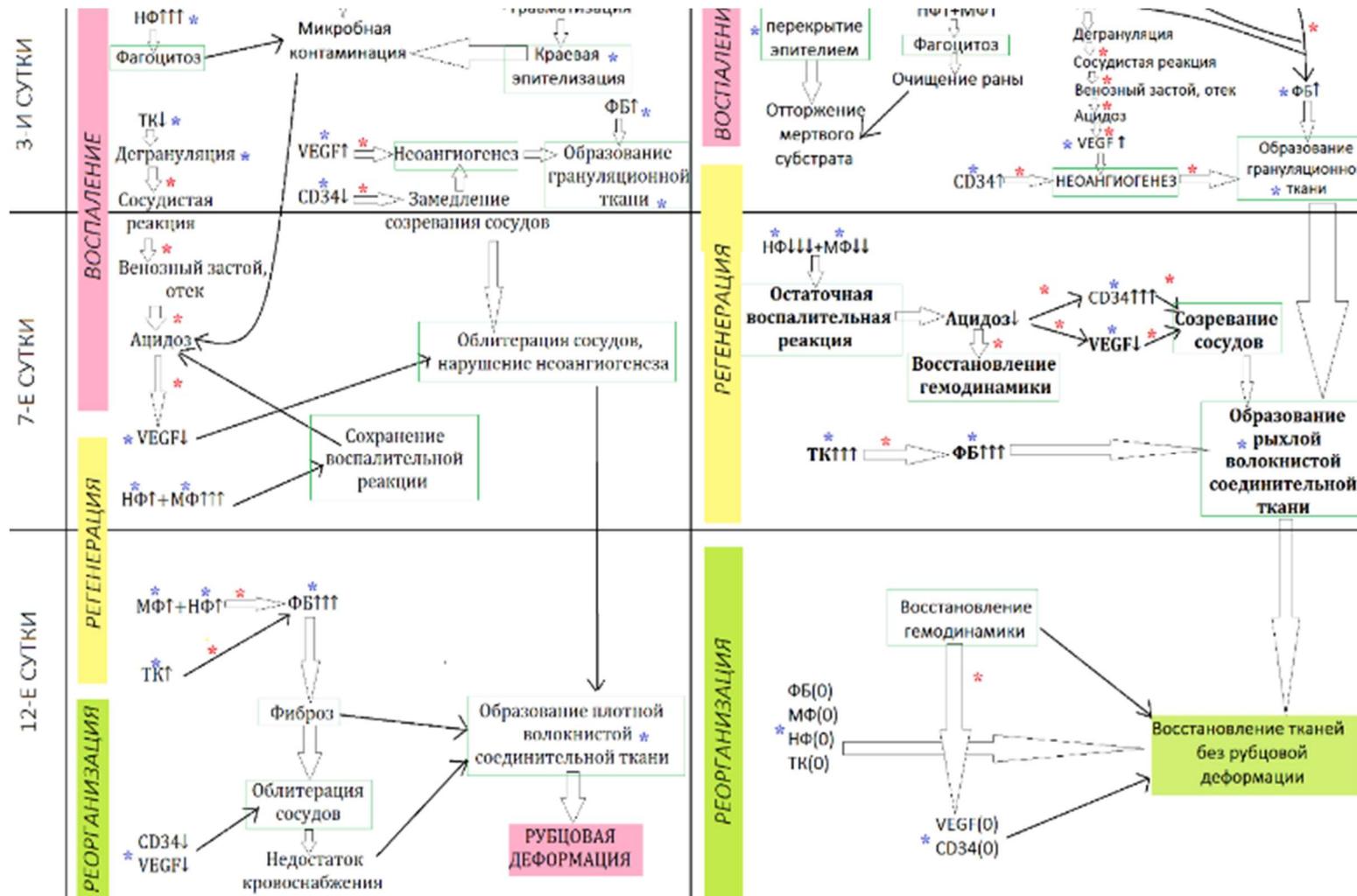


Рис. 84. Схема патоморфогенеза заживления раневого дефекта слизистой оболочки полости рта.

Синяя звездочка – данные собственных исследований, красная звездочка - по данным Bolbasov et al., 2020, Zhao N. et al., 2019, Vidal M.T. et al., 2013, Smanep-Filipova L. et al, 2016, Alim M.A. et al., 2020, зеленая рамка – ключевые события, ↑ - увеличение показателя, ↑↑↑ - выраженное увеличение показателя, ↓ - уменьшение показателя, ↓↓↓ - выраженное уменьшение показателя, (0) – достижение контрольного значения.

ВЫВОДЫ

1. Закрытие раневых дефектов слизистой оболочки полости рта полимерными пьезоэлектрическими мембранами способствовало смене стадии воспаления на стадию регенерации на 3-и сутки исследования и преимущественному образованию рыхлой волокнистой соединительной ткани с 7-ых суток исследования, в отличии от 1-ой экспериментальной группы, где воспалительная реакция сохранялась до 12-ых суток, а регенерация сопровождалась образованием обширных очагов плотной волокнистой соединительной ткани.

2. Использование полимерных пьезоэлектрических мембран стимулировало образование и созревание новых сосудов на 7-е сутки исследования, что приводило к восстановлению микроциркуляторного русла в области дефекта. В группе без покрытия признаки нарушения гемодинамики сохранялись на 12-е сутки исследования.

3. При использовании полимерных пьезоэлектрических мембран проращение периферических нервов, содержащих безмиелиновые нервные волокна, в область регенерирующего раневого дефекта определялось на 12-е сутки исследования, в группе без покрытия нервные элементы не визуализировались.

4. В условиях закрытия раневого дефекта полимерной пьезоэлектрической мембраной происходило полное перекрытие раневого дефекта эпителием на 3-и сутки и восстановление его толщины на 12-е сутки исследования. В группе без покрытия перекрытие раны эпителием обнаруживалось на 7-е сутки исследования, толщина эпителиального пласта не восстанавливалась до контрольных значений к 12-ым суткам, присутствовали патологические изменения в виде акантоза и акантолиза.

5. При использовании полимерного пьезоэлектрического покрытия, модифицированного медью, наблюдалось более выраженное снижение

воспалительной реакции, образование эпителиального пласта, рыхлой волокнистой соединительной ткани и восстановление ряда показателей гемодинамики по сравнению с другими экспериментальными группами.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

НИ ТПУ – национальный исследовательский Томский
политехнический университет

VDF-TeFE - винилиденфторид с тетрафторэтиленом

TGF- β - трансформирующий фактор роста-бета

EGF - эпидермальный фактора роста

ADM – бесклеточный кожный матрикс

CGF - концентрированным фактора роста

E.Coli - Escherichia coli

St.albus - Staphylococcus aureus

St.Aureus - Staphylococcus aureus

АТФ - аденозинтрифосфат

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Аксенов К.А. Особенности заживления хирургических ран в полости рта / К.А.Аксенов, М.В.Ломакин // Российская стоматология. – 2008. – Т. 1. – №1. – С. 69-72.
2. Андрусихина И.Н. Структура, свойства и токсичность наночастиц оксидов серебра и меди / И.Н. Андрусихина, И.А. Голуб, Г.Г. Дидикин, С.Е. Литвин, В.Ф. Горчев, В.А. Мовчан // Біотехнологія. – 2011. – Т. 4. – № 6. – С. 51-59.
3. Бабушкина И.В. Биологическая активность наночастиц меди в эксперименте / И.В. Бабушкина, Е.В. Гладкова, И.А. Мамонова, И.А. Норкин, Пучиньян Д.М. // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 6 – С. 1204-1207
4. Бледнов А.В. Перспективные направления в разработке новых перевязочных средств / А. В. Бледнов // Новости хирургии. – 2006. – Т. 14. – № 1. – С.9-19.
5. Борисова Н.В. Закономерности изменения свойств пленок меди в процессе термообработки / Н.В.Борисова, Э.П.Суровой, И.В.Титов // Известия Томского политехнического университета. – 2006. – Т. 309. – № 1. – Р. 86–91.
6. Быков В.Л. Тканевая, клеточная и молекулярная биология гемостаза и реэпителизации при заживлении ран слизистой оболочки полости рта / В.Л.Быков, И.В.Леонтьева, В.В.Кулаева, Е.А. Исеева. // Морфология. – 2019. – Т. 156. – № 6. – С. 64-76.
7. Васильев С. Ю. Опыт применения коллагеновой матрицы для пластики мягких тканей в зоне имплантации / С. Ю. Васильев // Дентал Юг – 2012. – №4. – С. 8-11.
8. Виноградов А.Б. Морфофункциональное обоснование воздействия лучей лазера на различные тканевые структуры: специальность

14.00.16 Патологическая физиология: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Виноградов Александр Борисович. – Санкт-Петербург, 2004. – 255 с.

9. Добрейкин Е.А. Антимикробная эффективность низкоинтенсивного лазерного излучения, наночастиц меди и их сочетанного применения в эксперименте / Е.А. Добрейкин, А.Ф. Тараскин, А.И. Урусова, С.И. Веретенников, Дьяконов И.Н., Рогожникова Е.А., Суздальцев С.Е. // Научное обозрение. Медицинские науки. – 2015. – № 1. – С.157-158.

10. Ефименко Н. А. Современные тенденции в создании биологически активных материалов для лечения гнойных ран / Н. А. Ефименко, М.П. Толстых, Ф.Е. Шин, А.С. Тепляшин // Военно-медицинский журнал. – 2002. – Т. 323 – № 1. – С. 48-52.

11. Киселев И.Л. Пути улучшения заживления послеоперационных ран в хирургическом лечении местно-распространенных опухолей головы и шеи / И.Л. Киселев, В.В. Хвостовой, Ю.С. Ворона, В.Е. Романищев, И.С. Ворона // Опухоли головы и шеи. – 2013. – № 1. – С. 29-32.

12. Кузин М.И. Общие принципы лечения гнойных ран. Методические рекомендации / М.И. Кузин, Б.М. Костюченко, И.И. Колкер. – Москва, 1985. – 31 с.

13. Медведев В.Л. Аутологичная плазма, обогащённая тромбоцитами: что это и для чего? / В.Л. Медведев, М.И. Коган, И.В. Михайлов, С.Н. Лепетунов // Вестник урологии. – 2020. – Т. 2. – № 8. – С. 67-77.

14. Миронов В.И. Раневой процесс: современные аспекты патогенеза / В.И.Миронов, И.И.Гилева // Сибирский медицинский журнал. — 2009. – № 6. – С. 20-25.

15. Привольнев В.В. Местное лечение ран и раневой инфекции по результатам анонимного анкетирования хирургов России / В.В.

Привольнев, Ю.С.Пасхалова, А.В.Родин, В.А.Митиш // Раны и раневые инфекции. – 2016. – Т. 3. – № 1. – С. 19-24.

16. Пронина Е.А. Особенности ангиогенеза при регенерации тканей кожи / Е.А. Пронина, Т.В. Степанова, Т.С. Кириязи, В.В. Масляков, А.Н. Иванов // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2019. – №1. – С. 104-107.

17. Рахметова А.А. Ранозаживляющие свойства мягких лекарственных форм с наночастицами меди и низкомолекулярными производными хитозана / А.А. Рахметова, О.А. Богословская, И.П. Ольховская, А.Н. Жигач, А.В. Ильина, В.П. Варламов, Н.Н. Глуценко // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – Т. 19. – № 7. – С. 12-18.

18. Родимин, Е.М. Приготовление целебных медно серебряных растворов и металлоионотерапия / Е.М. Родимин. — Москва: НОУ СТЦ, – 2003. – С. 144.

19. Рябова Д.А. Использование полимерной фосфолипидной матрицы для закрытия открытых ран на слизистой оболочке полости рта / Д.А.Рябова, Н.Ю. Орлинская, С.Н. Цыбусов, Н.Е. Хомутишникова, Р.Д. Лапшин, Е.А. Дурново // СТМ. – 2016. – Т. 8. – № 1 – С. 55-63.

20. Рязанцева Н.В. Экспериментальное обоснование эффективности раневой адсорбирующей повязки на основе наноструктурированного графита / Н.В. Рязанцева, Г.П. Хандорин, О.Л. Хасанов, Г.И. Дубов, А.В. Штейнле, В.И. Мазин, Л.А. Штейнле, О.Е. Чечина, А.В. Ратькин // Бюллетень сибирской медицины. – 2009. – Т. 4 – № 8. – С. 60-63.

21. Супильников А.А. Морфологические и физиологические аспекты течения раневого процесса (литературный обзор) / А.А.Супильников, А.А. Девяткин, О.Н. Павлова, О.Н. Гуленко // Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». – 2016. – № 3. – С. 144-151.

22. Ткаченко Т.В. Наночастицы как актуальное направление Исследованиц / Т.В. Ткаченко, А.С. Безрядиона // Международный студенческий научный вестник. – 2017. – № 4. – С.619-621.

23. Федоров Ю.И. Сравнительное изучение влияния металлов Ag, Си, Zn, Al в виде высоко дисперсного порошка и соли на рост *Escherichia coli* / Ю.И. Федоров, Л.А. Володина, Т.А. Кузовникова, В.С. Лебедев // Известия АН СССР, серия биологическая. – 1983. – № 6. – С. 948-950.

24. Шаповалова Е.Ю. Влияние ауто- и ксеногенных фибробластов и дермального эквивалента на содержание макрофагов в грануляционной ткани ишемизированной раны кожи на 12 сутки регенеративного гистогенеза / Е.Ю. Шаповалова, Г.А. Демяшкин, Т.А. Бойко, Ю.Г. Барановский, М.Н. Морозова, А.Г. Барановский, Е.С. Агеева // Влияние ауто- и ксеногенных фибробластов и дермального эквивалента на содержание макрофагов в грануляционной ткани ишемизированной раны кожи на 12 сутки регенеративного гистогенеза – Медицинский вестник Северного Кавказа – 2019. – Т. 14. – № 1. – С. 255–260.

25. Abdo J. Biologic and synthetic cellular and/or tissue-based products and smart wound dressings / J. Abdo, H. Ortman // Surgical Clinics of North America. – 2020. – Vol. 100 – № 4. – P. 741-756.

26. Alim M.A. Do mast cells have a role in tendon healing and inflammation? / M.A. Alim, M. Peterson, G. Pejler. Cells. – 2020. – Vol. 5 – № 9. – P. 1134.

27. Andersen L. Cell junctions in squamous epithelium during wound healing in palatal mucosa of guinea pigs / L. Andersen // Scandinavian journal of dental research. – 1980. – Vol. 88. – № 4. – P. 328–339.

28. Arias J.I. Surgical inflammation: a pathophysiological rainbow / J.L. Arias, M.A. Aller, J. Arias // Journal of translational medicine. – 2009. – Vol. 23. – № 7. – P. 19.

29. Assadian O. A prospective, randomized study of a novel transforming methacrylate dressing compared with a silver-containing sodium carboxymethylcellulose dressing on partial-thickness skin graft donor sites in burn patients. / O. Assadian, G. Purdue, A. Burriss A, E. Skrinjar, N. Duschek, D.J. Leaper // *International wound journal*. – 2015. – Vol. 3. – № 12. – P. 351-356.

30. Avishai E. Impaired wound healing: facts and hypotheses for multi-professional considerations in predictive, preventive and personalised medicine. / Avishai E., K. Yeghiazaryan, O. Golubnitschaja. // *EPMA Journal*. – 2017. – № 8 – P. 23-33.

31. Bailey S. A randomized comparison study of Aquacel Ag and Glucan II as donor site dressings with regard to healing time, cosmesis, infection rate, and patient's perceived pain: a pilot study. / S. Bailey, M. Carmean, M. Cinat, K. Burton, C. Lane, D. Malinoski // *Journal of burn care and research* . // - 2011. – Vol. 6. – № 32. – P. 627-632.

32. Bandekeri J.S. Resection of fibrous bands, extraction of third molars, bilateral coronoidotomy, masticatory muscle myotomy and comparison of collagen membrane and buccal fat pad graft in surgical management of stage III, IV oral submucous fibrosis. / J.S. Bandekeri, M.V. Ahmed, M.A.R. Patel // *International journal of clinical biochemistry and research*. – 2021. – Vol. 1. – № 7. – P. 15-19.

33. Badaraev A.D. Resource-Efficient Technologies PLLA scaffold modification using magnetron sputtering of the copper target to provide antibacterial properties / A.D. Badaraev, A.L.Nemoykina, E.N.Bolbasov, S.I. Tverdokhlebov // *Resource-efficient technologies*. – 2017. – Vol. 3. – № 2. – P. 204–211.

34. Baji A. Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties / A. Baji, Y.W. Mai, S.C. Wong, M. Abtahi, P. Chen // *Composites science and technology*. – 2010. – Vol. 70. – № 5. – P. 703-718.

35. Bao P. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing / P. Bao, A. Kodra, M. Tomic-Cacin, M.S. Golinko, H.P. Ehrlich, H. Brem // *Journal of surgical research*. – 2009 – Vol. 2. – № 153. – P. 347-358.

36. Bax D. V. Surface plasma modification and tropoelastin coating of a polyurethane co-polymer for enhanced cell attachment and reduced thrombogenicity / D. Bax, A. Kondyurin, A. Waterhouse, D.R. McKenzie, A.S. Weiss, M.M. Bilek // *Biomaterials*. – 2014. – Vol. 35. – № 25. – P. 6797–6809.

37. Bayramicli M. The mental V-Y island advancement flap in functional lower lip reconstruction / M. Bayramicli, A. Numanoglu A, E. Tezel // *Plastic and reconstructive surgery*. – 1997. – Vol. 100. – № 7. – P. 1682-1690.

38. Beech A. Use of the Integra skin regeneration system in an intraoral mandibular defect in osteoradionecrosis / A. Beech, J. Farrier // *International journal of oral and maxillofacial surgery*. – 2016. – Vol. 9. – № 45. – P. 1159-1161.

39. Behm B. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing / B. Behm, P. Babilas, M. Landthaler, S. Schreml // *Journal of european academy of dermatology and venereology*. – 2012. – Vol. 26. – P. 812–820.

40. Ben Amar M. Re-epithelialization: advancing epithelium frontier during wound healing / M.B. Amar, M. Wu // *Journal of royal society interface*. – 2014. – Vol.11. – P. 2013–1038.

41. Bhattacharya R. Effect of bacteria on the wound healing behavior of oral epithelial cells / R. Bhattacharya, F. Xu, G. Dong, C. Li Tian, B. Ponugoti, D.T. Graves // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9 – № 2. – P. 1-10.

42. Birkelbach M.A. In vitro feasibility analysis of a new sutureless wound-closure system based on a temperature-regulated laser and a transparent collagen membrane for laser tissue soldering (LTS) / M.A. Birkelbach, R. Smeets, I. Fiedler, L. Kluwe, M. Wehner, T. Trebst, P. Hartjen // *International journal of molecular science*. – 2020. – № 21. – P. 7104.

43. Bolbasov E.N. Structure and properties of nonwoven materials based

on copolymer of tetrafluoroethylene and vinylidene fluoride produced by aerodynamic formation / E.N. Bolbasov, S.I. Tverdokhlebov, V.M. Busnik, A. V. Pustovoitov // *Inorganic materials: applied research*. – 2015. – Vol. 6. – № 1. – P. 22–31.

44. Bolbasov E.N. The investigation of the production method influences on the structure and properties of the ferroelectric nonwoven materials based on vinylidene fluoride – tetrafluoroethylene copolymer / E.N. Bolbasov, K.S. Stankevich, E.A. Sudarev, V.M. Bouznic, V.L. Kudryavtseva, L.V. Antonova, V.G. Matveeva, Y.G. Anissimov, S.I. Tverdokhlebov // *Materials chemistry and physics* – 2016. – Vol. 182. – P. 338–346.

45. Brand H.S. Saliva and wound healing / H.S. Brand, E.C. Veerman // *The Chinese journal of dental research*. – 2013. – Vol. 16. – № 1. – P. 7–12.

46. Broussard K.C. Wound dressings: selecting the most appropriate type. K.C. Broussard, J.G. Powers // *American journal of clinical dermatology*. – 2013. – Vol. 6. – № 14. – P. 449-459.

47. Burghardt I. A dual function of copper in designing regenerative implants / I. Burghardt, F. Lüthen, C. Prinz, B. Kreikemeyer, C. Zietz, H.-G. Neumann, J. Rychly // *Biomaterials*. – 2015. – Vol. 44. – P. 36–44.

48. Butler D.P. Unifying algorithm in microvascular reconstruction of oral cavity defects using the trilaminar concept / D.P. Butler, J.A. Dunne, S.H. Wood, N.A. Jallali // *Plastic and reconstructive surgery*. – 2019. – Vol. 7. – №7. – P. e2267.

49. Carlavan I. Atrophic scar formation in patients with acne involves long-acting immune responses with plasma cells and alteration of sebaceous glands. I. Carlavan, B. Bertino, M. Rivier, P. Martel, V. Bourdes, M. Motte M, S. Déret, P. Reiniche, C. Menigot, A. Khammari, B. Dreno, P. Fogel, J.J. Voegel // *British journal of dermatology*. – 2018. – Vol. 4. – № 179. – P. 906-917.

50. Chen M. Cell attachment and biocompatibility of polytetrafluoroethylene (PTFE) treated with glow-discharge plasma of mixed

ammonia and oxygen / M. Chen, P.O. Zamora, P. Som, L.A. Peña, S. Osaki // Journal of biomaterials science polymer edition – 2003. – Vol. 14. – № 9. – P. 917–935.

51. Chen Y.H. Antimicrobial brass coatings prepared on poly(ethylene terephthalate) textile by high power impulse magnetron sputtering / Y.H. Chen, G.W. Wu, J.L. He // Materials science and engineering. – 2015. – № 48. – P. 41–47.

52. Coden M.E. Eosinophils in wound healing and epithelial remodeling: Is coagulation a missing link? / M.E. Coden, S. Berdnikovs // Journal of leukocyte biology. – 2020. – Vol. 1. – № 108. – P. 93-103.

53. Des Jardins-Park H. E. The spectrum of scarring in craniofacial wound repair / H. E. Des Jardins-Park, S. Mascharak, M.S. Chinta, D.C. Wan, M.T. Longaker // Frontiers in physiology. – 2019. – Vol.10. – P.322.

54. De Ryck T. Microbial inhibition of oral epithelial wound recovery: potential role for quorum sensing molecules? / T. De Ryck, E. Vanlancker, C. Grootaert, B.I. Roman, L.M. De Coen, I. Vandenberghe, C.V. Stevens, M. Bracke, T. Van de Wiele, B. Vanhoecke // AMB Express. – 2015. – Vol. 5. – Article № 27.

55. Duca M.D. Surface modifications of polyvinylidene fluoride (PVDF) under rf Ar splasma / M.D. Duca, C.L. Plosceanu, T. Pop // Polymer degradation and stability. – 1998. – Vol. 61 – № 1. – P. 65-72.

56. Freedberg I.M. Keratins and the keratinocyte activation cycle / I.M. Freedberg, M. Tomic-Canic, M. Komine, M. Blumenberg // Journal of investigative dermatology. – 2001. – Vol. 116. – P. 633–640.

57. Fujiwara K. Primary closure with posteriorly based lateral tongue flap reconstruction after transoral videolaryngoscopic surgery for tonsil cancer / K. Fujiwara, S. Koyama, T. Fukuhara, R. Donishi, T. Morisaki, H. Kataoka, H. Takauchi // Ear, nose and throat journal. – 2020. – Vol. 101. – Vol. 3. – P. 100-104.

58. Fujiwara M. Real-time assessment of guided bone regeneration in critical size mandibular bone defects in rats using collagen membranes with adjunct fibroblast growth factor-2 / M. Fujiwara, T. Takayama, T. Yamamoto, Y. Ozawa, M. Senoo, M. Ozaki, S. Yamano, S. Sato // *Journal of dental science*. – 2021. – Vol. 16. – № 4. – P. 1170-1181.

59. Gawaz M. Platelets in tissue repair: control of apoptosis and interactions with regenerative cells / M. Gawaz, S. Vogel // *Blood*. – 2013. – Vol. 122. – P. 2550–2554.

60. Godin M. Gore-tex chin implants: a review of 324 cases / M. Godin, L. Costa, T. Romo, W. Truswell, T. Wang, E. Williams // *Archives of facial plastic surgery*. – 2003. – Vol. 5. – № 3. – P. 224–227.

61. Golebiewska E.M. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond / E.M. Golebiewska, A.W. Poole // *Blood reviews*. – 2015. – Vol. 29. – № 3. – P. 153-162.

62. Graça M.F.P. Hyaluronic acid-based wound dressings: a review / M.F.P. Graça, S.P. Miguel, C.S.D. Cabral, I.J. Correia // *Carbohydrate polymers*. – 2020. – Vol. 241. – № 1. – P. 116364.

63. Grill A. Cold plasma in materials fabrication / A. Grill // New York: IEEE Press. – 1994. – P.272.

64. Gueldenpfennig T. The condensation of collagen leads to an extended standing time and a decreased pro-inflammatory tissue response to a newly developed pericardium-based barrier membrane for guided bone regeneration / T. Gueldenpfennig, A. Houshmand, S. Najman, S. Stojanovic, T. Korzinskas, R. Smeets, M. Gosau, J. Pissarek, S. Emmert, O. Jung // *In vivo*. – 2020. – Vol. 34 – P. 985–1000.

65. Guo H.F. Piezoelectric PU/PVDF electrospun scaffolds for wound healing applications / H.F. Guo, Z.S. Li, S.W. Dong, W.J. Chen, L. Deng, Y.F. Wang, D.J. Ying // *Colloids and surfaces B: biointerfaces*. – 2012. – Vol. 96. – P. 29–36.

66. Hakkinen L. Cell and Molecular Biology of Wound Healing. In: Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences / L. Hakkinen, L. Koivisto, J. Heino, H. Larjava: eddition by A. Vishwakarma, P. Sharpe, S. Shi, M. Ramalingam - Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York et al.: Elsevier — Academic Press, 2015. – P. 669–690.

67. Hou W. Stable polytetrafluoroethylene superhydrophobic surface with lotus-leaf structure / W. Hou, Q. Wang // Journal of colloid and interface science – 2009. – Vol. 333. – № 1. – P. 400–403.

68. Huang C. High-strength mats from electrospun poly (p-phenylene biphenyltetracarboximide) nanofibers / C. Huang, S. Chen, D.H. Reneker, C. Lai, H. Hou // Advanced materials. – 2006. – Vol. 18. – № 5. – P. 668-671.

69. Hulseley A. Clinical usage and economic effectiveness of a recently developed epidermal autograf harvesting system in 13 chronic wound patients in a university-based wound center / A. Husley, P. Linneman, J. Litt // Cureus. – 2016. – Vol. 11. – № 8. – P. e878.

70. Jasthi C.V. Data regarding clinical evaluation of collagen membrane in oralmucosal defects due to oral submucous fibrosis and leukoplakia / C.V. Jasthi, T. Shamim // Data in brief. – 2018. – Vol. 18. P. 607-612.

71. Jiang D. Injury triggers fascia fibroblast collective cell migration to drive scar formation through N-cadherin / D. Jiang, S. Christ, D. Correa-Gallegos, P. Ramesh, S.K. Gopal, J. Wannemacher, C.H. Mayr, V. Lupperger, Q. Yu, H. Ye, M. Mück-Häusl, V. Rajendran, L. Wan, J. Liu, U. Mirastschijski, T. Volz, C. Marr, H.B. Schiller, Y. Rinkevich // Nature communications. – 2020. – Vol. 11. – P. 5653.

72. Kagami A. Regeneration of keratinocytes, Langerhans cells, Merkel cells and melanocytes after removal of the palatal mucosa in the early healing period / A. Kagami, K. Matsuzaka, K. Kokubun, T. Inoue // Journal of Japanese society of oral mucous membrane. – 2010. – Vol. 16. – № 1. – P. 1.

73. Johnson K.E. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the regulation of cutaneous wound repair / K.E. Johnson, T.A. Wilgus // *Advances in wound care.* – 2014. – P. 647-661.

74. Kim H.S. Inducing re-epithelialization in skin wound through cultured oral mucosal keratinocytes / H.S. Kim, N.I. Kim, J. Kim // *Original article.* – 2014. – P. 63-70.

75. Kim J.F. Thermally induced phase separation and electrospinning methods for emerging membrane applications: a review / J.F. Kim, Y.M. Lee, E. Drioli // *Advances in materials: separations: materials, devices and processes* – 2016. – Vol. 62. – № 2. – P. 461–490.

76. Kim M.K. The use of the buccal fat pad flap for oral reconstruction / M.K. Kim, W. Han, S.G. Kim // *Maxillofacial plastic reconstructive surgery.* – 2017. – Vol. 39. – № 5.

77. Kinikoglu B. The influence of elastin-like recombinant polymer on the selfrenewing potential of a 3D tissue equivalent derived from human lamina propria fibroblasts and oral epithelial cells / B. Kinikoglu, J.C. Rodriguez-Cabello, O. Damour, V. Hasirci // *Biomaterials.* – Vol. 32. – P. 5756–5764.

78. Kloc M. Macrophage functions in wound healing / M. Kloc, R.M. Ghobrial, J. Wosik, A. Lewicka, S. Lewicki, J.Z. Kubiak // *Journal of tissue engenering regeneration medicine.* – 2019. – Vol. 13. – № 1. – P. 99-109.

79. Kloukos D. Gingival thickness assessment at the mandibular incisors with four methods: a cross-sectional study / D. Kloukos, G. Koukos, I. Doulis, A. Sculean, A. Stavropoulos, C. Katsaros // *Journal of periodontology.* – 2018. Vol. 89. – № 11. – P. 1300–1309.

80. Koivisto L. Re-epithelialization of wounds / L. Koivisto, L. Häkkinen, H. Larjava // *Endodontic topics.* – 2012. – Vol. 24. – P. 59–93.

81. Kolská Z. PTFE surface modification by Ar plasma and its characterization / Z. Kolská, A. Řezníčková, V. Hnatowicz, V. Švorčík // *Vacuum.* – 2012. – Vol. 86. – № 6. – P. 643-647.

82. Koombhongse S. Flat polymer ribbons and other shapes by electrospinning / S. Koombhongse, W. Liu, D.H. Reneker // Journal of polymer science. Part B: polymer physics. – 2001. – Vol. 39. - № 21. – P. 2598–2606.

83. Kotwal G.J. Macrophage differentiation in normal and accelerated wound healing / G.J. Kotwal, S. Chien // Results and problems in cell differentiation. – 2017. – Vol. 62. – P. 353-364.

84. Krishnan K. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease / K. Krishnan, T. Chen, B.J. Paster // Oral diseases. – 2017. – Vol. 23. – № 3. – P. 276–286.

85. Kumar S. Collagen membrane: a new concept in surgical management for mucosal defect in oral sub mucous fibrosis / S. Kumar, N. Dipti, K. Musaab, R. Reshu Rastogi, S. Vaishali Samant // Nepal journals online. – 2021. – Vol. 12. - № 8. – P. 71-75.

86. Kumar V. Tongue flap reconstruction in carcinoma of oral cavity: an institutional experience / V. Kumar, S. Mukharjee, N. Akhtar, S. Rajan, A. Chaturvedi, S. Misra, S. Gupta, P. Prakash, S. Das // Journal of maxillofacial oral surgery. – 2019. – Vol. 18. – P. 428–31.

87. Laroche G. Polyvinylidene fluoride (PVDF) as a biomaterial: From polymeric raw material to monofilament vascular suture / G. Laroche, Y. Marois, R. Guidoin, M.W. King, L. Martin, T. How, Y. Douville // Journal of biomedical materials researches. – 1995. – Vol. 29. – № 12. – P. 1525-1536.

88. Lee K. Accelerated oral wound healing using a pre-vascularized mucosal cell sheet / K. Lee, E.H. Kim, D. Shin, J.L. Roh // Scientific reports. – 2017. – Vol. 7. - № 1. – P. 10677.

89. Li Y. Electrospun polyvinylidene fluoride-based fibrous scaffolds with piezoelectric characteristics for bone and neural tissue engineering / Y. Li, C. Liao, S.C. Tjong // Nanomaterials (Basel). – 2019. – Vol. 9. – №7. – P.952.

90. Lucas T. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair / T. Lucas, A. Waisman, R. Ranjan, J. Roes, T. Krieg, W. Müller, A. Roers,

S.A. Eming // *Journal of immunology results*. – 2010. – Vol. 184. – P. 3964–3977.

91. Mandal O. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application / O. Mandal, M.E. Bolander, G. Sarkar, O. Mukhopadhyay, P. Mukherjee // *Applied microbiology and biotechnology* – 2006. – Vol. 69. – № 5 – P. 485-492.

92. Mangia A. Tissue remodeling in breast cancer: human mast cell tryptase as an initiator of myofibroblasts differentiation / A. Mangia, A. Malfettone, R. Rossi, A. Paradiso, G. Ranieri, G. Simone // *Histopathology*. – 2011. – Vol. 58. – № 7. – P. 1096-1106.

93. Maqusood A. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles / A. Maqusood, A. Hisham, M.A. Majeed, K. Khan // *Journal of nanomaterials*. – 2014. – № 3. – P. 1-4.

94. McLaurin W.S, Krishnan D. Preprosthetic Dentoalveolar Surgery. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. – 2020. – Vol. 32. – № 4. – P. 583-591.

95. Mieler I. The Edlan/Mejchar surgical method and its modifications / I. Mieler, S. // *Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl*. – 1986. – Vol. 74. - № 3. – P. 249-58.

96. Mittal G. Flaps for oral and maxillofacial reconstruction: review of literature and a clinical guide to the clinicians / G. Mittal, A. Agarwal, G. Kataria // *Asian journal of oncology*. – 2018. – № 4. – P. 037-042.

97. Moschouris K. The application of cell sheet engineering in the vascularization of tissue regeneration / K. Moschouris, N. Firoozi, Y. Kang // *Regenerative medicine*. – 2016. – № 6. – P. 559–570.

98. Movaniya P.N. Efficacy of collagen membrane graft in intraoral surgery - an evaluative study / P.N. Movaniya, T.R. Makwana, N.N. Desai, K.G. Makwana, H.B. Patel // *Annals of maxillofacial surgery*. – 2021. Vol. 11. - № 1. - P. 42-48.

99. Mutschelknauss R. Long-term results of treated bi- and trifurcations in periodontitis profunda / R. Long-term results of treated bi- and trifurcations in

periodontitis profunda, B. Simon B, W. Blair // Deutsche zahnärztliche zeitschrift. – 1991. – Vol. 46. – № 5. – P. 362-366.

100. Nasef M.M. Thermal stability of radiation grafted PTFE-g-polystyrene sulfonic acid membranes / M.M. Nasef // Polymer degradation and stability. – 2000. – Vol. 68. – № 2. – P. 231–238.

101. Nazir M.A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention / M.A. Nazir // International journal of health sciences (Qassim). – 2017. – Vol. 11. – № 2. – P. 72-80.

102. Naung N.Y. Resorbable versus nonresorbable membranes: when and why? / N.Y. Naung, E. Shehata, J.E. Van Sickels // Dental clinics of North America. – 2019. - Vol. 63. – № 3. – P. 419-431.

103. Neuss S. Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering / S. Neuss, C. Apel, P. Buttler, B. Denecke, A. Dhanasingh, X. Ding, D. Grafahrend, A. Groger, K. Hemmrich, A. Herr, W. Jahnen-Dechent, S. Mastitskaya, A. Perez-Bouza, S. Rosewick, J. Salber, M. Wöltje, M. Zenke // Biomaterials. – 2008. – Vol. 29. – № 3. – P. 302–313.

104. Nielsen J. S. Novel functions of the CD34 family / J.S. Nielsen, K.M. McNagny // Journal of cell science. – 2008. – Vol. 121. – №. 22. – P. 3683-3692.

105. Noh I. Surface modification of poly(tetrafluoroethylene) with benzophenone and sodium hydride by ultraviolet irradiation / I. Noh, K. Chittur, S.L. Goodman, J.A. Hubbell // Journal of polymer science part a polymer chemistry – 1997. – Vol. 35. – № 8. – P. 1499–1514.

106. Omelchenko T. Rho-dependent formation of epithelial «leader» cells during wound healing - T. Omelchenko, J.M. Vasiliev, I.M. Gelfand, H.H. Feder, E.M. Bonder // PNAS. – 2003. – Vol.100 – № 19. – P.10788–10793.

107. Onyekwelu I. Surgical wound classification and surgical site infections in the orthopaedic patient / I. Onyekwelu, R. Yakkanti, L. Protzer, C.M. Pinkston, C. Tucker, D. Seligson D // Journal of American academy of orthopedic surgeons global research and reviews. – 2017. – Vol. 3. – № 1. – P. e022.

108. Pandey A. Comparative evaluation of buccal pad of fat with and without bovine collagen membrane in the management of oral submucous fibrosis: A prospective clinical study / A. Padney, N.K. Sharma, N.K. Dhiman, C. Jaiswara, P. Tiwari, A.K. Singh, V. Verma, S. Singh // National journal of maxillofacial surgery. – 2020. – № 11. P. 57-63.

109. Prato G.P. Periodontal plastic and mucogingival surgery / G.P. Prato, C. Clauser, P. Cortellini // Periodontology. – 2000. – 1995 – № 9. – P. 90-105.

110. Pardali E. Signaling by members of the TGFbeta family in vascular morphogenesis and disease / E. Pardali, M.J. Goumans, P. Dijke // Trends cell biology. - 2010. – № 20. – P. 556-67.

111. Pereira D. A scarless healing tale: comparing homeostasis and wound healing of oral mucosa with skin and oesophagus / D. Pereira, I. Sequeira // Frontiers in cell and developmental biology. – 2021. – № 9. – P. 682143.

112. Politis C. Wound healing problems in the mouth / C. Politis, J. Schoenaers, R. Jacobs, J.O. Agbaje // Frontiers in physiology. – 2016. – Vol. 7. – № 2. – P. 1-13.

113. Rastogi S. The efficacy of collagen membrane as a biodegradable wound dressing material for surgical defects of oral mucosa / S. Rastogi, M. Modi, B. Sathian // Journal of oral and maxillofacial surgery. – 2006. – № 67. – P. 1600-1606.

114. Reddy Y.R. Role of collagen impregnated with dexamethasone and placetrin in patients with oral submucous fibrosis / Y.R. Reddy, N. Srinath, H. Nandakumar., M.R. Kanth // Journal of maxillofacial and oral surgery. – 2012. – Vol. 11. – № 2. – P. 166-170.

115. Reinke J. M. Wound repair and regeneration / J.M. Reinke, H. Sorg // European surgical research. – 2012. – Vol. 49. – № 1. – P. 35–43.

116. Rezvani Ghomi E. Wound dressings: Current advances and future directions / E. Rezvani Ghomi, S. Khalili, S. Nouri Khorasani, R. Esmaeely

Neisiany, S. Ramakrishna // *Journal of applied polymer science*. – 2019. – Vol. 136. – № 27. – P. e47738.

117. Ribatti D. Mast cells and macrophages exert beneficial and detrimental effects on tumor progression and angiogenesis / D. Ribatti // *Immunology letters*. – 2013. – Vol. 152. – № 2. – P. 83-88.

118. Rigby M.H. Soft tissue reconstruction of the oral cavity: a review of current options. M.H. Rigby, S.M. Taylor // *Current opinion in otolaryngology and head and neck surgery*. – 2013. – Vol. 21. – № 4. – P. 311-317.

119. Rodero M.P. Skin wound healing modulation by macrophages / M.P. Rodero, K. Khosrotehrani // *International journal of clinical and experimental pathology*. – 2010. – Vol. 25. – № 7. – P.643–653.

120. Rodrigues M. Wound healing: a cellular perspective / M. Rodrigues, N. Kosaric, C.A. Bonham, G.C. Gurtner // *Physiology reviews*. – 2019. – Vol. 99. – № 1. – P. 665–706.

121. Rogn Rognoni E. Fibroblast state switching orchestrates dermal maturation and wound healing / E. Rogn Rognoni, A.O. Pisco, T. Hiratsuka, K.H. Sipilä, J.M. Belmonte, S.A. Mobasser, C. Philippeos, R. Dilao, F.M. Watt // *Molecular systems biology*. – 2018. – Vol. 14. – № 8. – P. e8174.

122. Roh J.L. Promotion of oral surgical wound healing using autologous mucosal cell sheets. J.L. Roh, H. Jang, J. Lee, E.H. Kim, D. Shin // *Oral oncology*. – 2017. – № 69. – P. 84–91.

123. Rørth P. Collective cell migration / Rørth P. // *Annual review of cell and developmental biology*. – 2009. – Vol. 25. – P. 407–429.

124. Rousselle P. Re-epithelialization of adult skin wounds: cellular mechanisms and therapeutic strategies / P. Rousselle, F. Braye, G. Dayan // *Advanced drug delivery reviews*. – 2019. – Vol. 146. – P. 344–65.

125. Rua Gonzalez L. Use of Integra in oral reconstruction: a case series / L. Rua Gonzalez, A.L. de Villalain, A. Novoa Gomez, J.C. de Vicente

Rodriguez, G.I. Pena // Oral Surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology. – 2018. – Vol. 125. – №3. – P. e72-e75.

126. Sadig W. Risk factors and management of dehiscence wounds in implant dentistry / W. Sadig, K. Almas // Implant Dentistry. – 2004. – Vol. 13. – № 2. – P. 140–147.

127. Salcido R. Healing by intention / R. Salcido // Advances in skin and wound care. – 2017. – Vol. 30. – № 6. – P. 246-247.

128. Schoenichen C. Role of platelet serotonin in innate immune cell recruitment / C. Schoenichen, C. Bode, D. Duerschmied // Frontiers of bioscience (Landmark Ed). – 2019. – Vol. 24. – P. 514–526.

129. Sculean A. Soft tissue wound healing around teeth and dental implants / A. Sculean, R. Gruber, D.D. Bosshardt // Journal of clinical periodontology. – 2014. – Vol. 41. – P. 6–22.

130. Serebryanaya N.B. Blood platelets as activators and regulators of inflammatory and immune reactions. Part 1. Basic characteristics of platelets as inflammatory cells / N.B. Serebryanaya, S.N. Shanin, E.E. Fomicheva, P.P. Yakutseni // Meditsinskaya immunologiya. – 2018. – Vol. 20. – № 6. – P.785–796.

131. Sen C.K. Wound healing essentials: let there be oxygen / C.K. Sen // Wound Repair Regen. – 2009. – Vol. 17. – № 1. – P.1–18.

132. Serra M.B. From inflammation to current and alternative therapies involved in wound healing. Int / M.B. Serra, W.A. Barroso, N.N. da Silva NN, A.C.R. Borges, I.C. Abreu IC, M.O.D.R. Borges // Journal of inflammation. – 2017. – Vol. 2017. – P. 1–17.

133. Shanmugam D. Evaluation of bovine-derived collagen membrane in oral surgical mucosal defects / D. Shanmugam, N. Dominic N. // Journal of maxillofacial and oral surgery. – 2019. – Vol. 18. – № 3. – P. 466-473.

134. Shao H.-J. Designing a three-dimensional expanded polytetrafluoroethylene-poly (lactic-co-glycolic acid) scaffold for tissue

engineering. / H.-J. Shao, C.S. Chen, I.-C. Lee, J.-H. Wang, T.-H. Young // *Artificial organs*. – 2009. – Vol. 33. – № 4. – P. 309–317.

135. Shaw T.J. Wound repair at a glance / T.J. Shaw, P. Martin // *Journal of cell sciences*. – 2009. – Vol.122. – P. 3209–3213.

136. Shrestha B. Clark's technique of vestibuloplasty - a case report case report / B. Shrestha, S. Pradhan // *Journal of Nepalese society of periodontology and oral implantology*. – 2021. – № 4. – P. 93-95.

137. Shapouri-Moghaddam A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease / A. Shapouri-Moghaddam, S. Mohammadian, H. Vazini, M. Taghadosi, S.A. Esmaeili, F. Mardani, B. Seifi, A. Mohammadi, J.T. Afshari, A. Sahebkar // *Journal of cell physiology*. – 2018. – Vol. 233. – № 9. – P.6425-6440.

138. Sibbald R.G. Wound bed preparation / R.G. Sibbald, J.A. Elliott, R. Persaud-Jaimangal, L. Goodman, D.G. Armstrong, C. Harley, S. Coelho, N. Xi, R. Evans, D.O. Mayer, X. Zhao, J. Heil, B. Kotru, B. Delmore, K. LeBlanc, E.A. Ayello, H. Smart, G. Tariq, A. Alavi, R. Somayaji // *Advances in skin and wound care*. – 2021. – Vol. 34. - №4. – P. 183-195.

139. Simone S. Preparation of hollow fibre membranes from PVDF/PVP blends and their application in VMD / S. Simone, A. Figoli, A. Criscuoli, M.C. Carnevale, A. Rosselli, E. Drioli // *Journal of membrane science* – 2010. – Vol. 364. – № 1–2. – P. 219–232.

140. Singer A.J. Healing mechanisms in cutaneous wounds: tipping the balance / A.J. Singer // *Tissue engineering part B: reviews*. - 2022. Mar 11. doi: 10.1089/ten.TEB.2021.0114. Epub ahead of print. PMID: 34915757.

141. Singh G. Collagen membrane over buccal fat pad versus buccal fat pad in management of oral submucous fibrosis: a comparative prospective study / G. Singh, M. Mishra, A. Gaur, A. Srivastava, B. Shukla, G. Das // *Journal of maxillofacial and oral surgery*. – 2018. – Vol. 17. – P. 482-487.

142. Sîrbulescu R.F. Mature B cells accelerate wound healing after acute

and chronic diabetic skin lesions / R.F. Sîrbulescu, C.K. Boehm, E. Soon, M.Q. Wilks, I. Ilieş, H. Yuan, B. Maxner, N. Chronos, C. Kaittanis, M.D. Normandin, G. El Fakhri, D.P. Orgill, A.E. Sluder, M.C. Poznansky // *Wound Repair Regeneration*. – 2017. – Vol. 25. – № 5. – P. 774-791.

143. Smane-Filipova L. Immunohistochemical analysis of nestin, CD34 and TGF β 3 in facial tissue of children with complete unilateral and bilateral cleft lip and palate / L. Smane – Filipova, M. Pilmane, I. Akota // *Stomatologija*. – 2016. – Vol. 18 - № 3. – P. 98-104.

144. Smigiel K.S. Macrophages, wound healing, and fibrosis: recent insights / K.S. Smigiel, W.C. Parks // *Current rheumatology reports*. – 2018. – Vol. 20. – № 4. – P. 17.

145. Smith P., Martinez C. Wound Healing in the Oral Mucosa. In: *Oral Mucosa in Health and Disease: A Concise Handbook* / Ed. by Bergmeier L. A. Cham. – Switzerland: Springer Int. Publ. AG, 2018. – P. 77–91.

146. Solanki N.S. A randomised prospective study of split skin graft donor site dressings: AWBAT-D vs. Duoderm (R) / N.S. Solanki, I.P. Mackie, J.E. Greenwood // *Burns*. – 2012. Vol. 38. – № 6. – P. 889-898.

147. Sourav K. Collagen membrane: A new concept in surgical management for mucosal defect in oral sub mucous fibrosis / S. Kumar, D. Nayak, S. Kumar, M. Khan, R. Rastogi, V. Samant // *Asian Journal of Medical Sciences*. – Vol. 12. – № 8. – P. 71–75.

148. Soutar D.S. The radial forearm flap: a versatile method for intra-oral reconstruction / D.S. Soutar, L.R. Scheker, N.S.B. Tanner, I.A. McGregor // *British journal of plastic surgery*. – 1983. – Vol. 36. – № 1. – P. 1–8.

149. Srivastava A. Reconstruction of intraoral oncologic surgical defects with Integra ® bilayer wound matrix / A. Srivastva, A. Maniakas, J. Myers, M. Chambers, R. Cardoso // *Clinical case reports*. – 2021. – Vol. 9. – № 1. – P. 213-219.

150. Stenn K.S. The Molecular and cellular biology of wound repair/ K.S. Stenn, P.M. Hensen, R.A.F. Clark. - New York: Plenum. - 1988. - P. 321–335.

151. Suzuki Y. Early wound healing of the hard-palate mucosal harvest site using artificial dermis fixation by a transparent plate / Y. Suzuki, I. Tanaka, S. Sakai, T. Yamauchi // *Archive of plastic surgery*. – 2021. – Vol. 48. – № 2. – P. 208-212.

152. Tai Y. Myofibroblasts: function, formation, and scope of molecular therapies for skin fibrosis / Y. Tai, E.L. Woods, J. Dally, D. Kong, R. Steadman, R. Moseley, A.C. Midgley // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11. – № 8. – P. 1095.

153. Tiefengraber J. Orthodontic space closure in combination with membrane supported healing of extraction sockets (MHE). A pilot study / J. Tiefengraber, P. Diedrich, U. Fritz, P. Lantos // *Journal of orofacial orthopedics*. – 2002. – Vol. 63. – № 5. – P. 422–428.

154. Teller P. The physiology of wound healing: injury through maturation / P.Teller, T. K. White // *Perioperative nursing clinics*. – 2011. – Vol. 6. – № 2. – P. 159– 170.

155. Trepap X. Cell migration / X. Trepap, Z. Chen, K. Jacobson // *Comprehensive physiology*. – 2012. – Vol. 2. – № 4. – P. 2369–2392.

156. Tutak W. The support of bone marrow stromal cell differentiation by airbrushed nanofiber scaffolds / W. Tutak, S. Sarkar, S. Lin-gibson, T.M. Farooque, G. Jyotsnendu, D. Wang, J. Kohn, D. Bolikal, C.G. Simon // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34. – № 10. – P. 2389–2398.

157. Tverdokhlebov S.I. Research of the surface properties of the thermoplastic copolymer of vinylidene fluoride and tetrafluoroethylene modified with radio-frequency magnetron sputtering for medical application / S.I. Tverdokhlebov, E.N. Bolbasov, E.V. Shesterikov, A.I. Malchikhina, V.A. Novikov, Y.G. Anissimov // *Applied surface science*. – 2012. – Vol. 263. – P. 187–194.

158. Ud-Din S. Mast cells in skin scarring: a review of animal and human

research / S. Ud-Din, T.A. Wilgus, A. Bayat // *Frontiers in immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 552205.

159. Urban I.A Evaluation of the combination of strip gingival grafts and a xenogeneic collagen matrix for the treatment of severe mucogingival defects: a human histologic study / I.A. Urban, K. Nagy, S. Werner, M. Meyer // *International journal of periodontics restorative dentistry*. – 2019. – Vol. 39. – №1. – P. 9–14.

160. Van der Veer W.M. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation / W.M. van der Veer, M.C.T. Bloemen, M.M. W. Ulrich, G. Molema, P. P. van Zuijlen, E.Middelkoop, F. B. Niessen // *Burns*. – 2009. – Vol. 35. – № 1. – P. 15-29.

161. Vastani A Collagen membrane for reconstruction of soft tissue defects after surgery of oral cancer and precancer: a brief review / A. Vastani, N. Chourasia, V. Pahlajani, S. Choubey // *Plastic and aesthetic research*. – 2016. – №3. – P. 100-105.

162. Vasuri F. Facing the enigma of the vascular network in hepatocellular carcinomas in cirrhotic and non-cirrhotic livers / F. Vasuri, S. Fittipaldi, F. Giunchi, M. Monica, M. Ravaioli, A. Degiovanni, S. Bonora, R. Golfieri, L. Bolondi, W.F. Grigioni, G. Pasquinelli, A. D'Errico-Grigioni // *Journal of clinical pathology*. – 2016. – Vol. 69. – P. 102–108.

163. Vidal MT. Density of mast cells and microvessels in minor salivary gland tumors / M.T. Vidal, I.B. de Oliveira Araújo, C.A. Gurgel, A. Pereira Fde, D.S. Vilas-Bôas, E.A. Ramos // *Tumor Biology*. – 2013. – Vol. 34. – №1. – P. 309-316.

164. Velnar T. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. / T. Velnar, T. Bailey, V. Smrkolj // *Journal of international medical researches*. – 2009. – Vol. 37. – № 5. – P. 1528-1542.

165. Wang, H. Anti-inflammatory cytokine TSG-6 inhibits hypertrophic scar formation in a rabbit ear model / H. Wang, Z. Chen, X.J. Li, L. Ma, Y.L. Tang // *European journal of pharmacology*. – 2015. – Vol. 751. – P. 42–49.

166. Wang P.H. Wound healing / P.H. Wang, B.S. Huang, H.C. Horng, C.C. Yeh, Y.J. Chen // *Journal of Chinese medical association* – 2018. – Vol. 81. – № 2. – P. 94–101.

167. Weber N. Characterization and in vitro cytocompatibility of piezoelectric electrospun scaffolds / N. Weber, Y.S. Lee, S. Shanmugasundaram, M. Jaffe, T.L. Arinze // *Acta Biomaterialia*. – 2010. – Vol. 6. - № 9. – P. 3550-3556.

168. Wehrhan F. Salient features of the oral mucosa / In: *Essential tissue healing of the face and neck* // S. Schultze-Mosgau, H. Schliephake / Ed. by Hom D. B., Hebda P. A., Gosain A. K., Friedman C. D. Shelton (CT). – People's Medical Publishing House. BC Decker Inc. , 2009. – P. 83–99.

169. Wimmer G. Preprosthetic plastic soft-tissue surgery. Vestibular gingival extension with a free mucosal graft / G. Wimmer, E. Parsche, C. Ruda, M. Lorenzoni, R. Polansky, R.O. Bratschko // *Schweizer Monatsschrift fur Zahnmedizin*. – Vol. 110. – № 9. – P. 484–495.

170. Winter GF. Medical-grade honey dressing use in developing countries / *Advances in skin wound care*. – 2017. – № 11. – P. 1-3.

171. Xiao T. Proinflammatory cytokines regulate epidermal stem cells in wound epithelialization / T. Xizo, Z. Yan, S. Xiao, Y. Xia // *Stem cell research and therapy*. – 2020. – Vol. 232. – № 11. – P. 232.

172. Xu X. Application of an acellular dermal matrix to a rabbit model of oral mucosal defects / X. Xu, N. Cui, E. Wang, / *Experimental and therapeutic medicine*. – 2018. – Vol. 15. – № 3. – P. 2450-2456.

173. Yang J.A. A mini review: electrospun hierarchical nanofibers / J.A. Yang, S. Zhan, N. Wang, X. Wang, Y. Li, Y. Li, W. Ma, H. Yu // *Journal of dispersion science technology* – 2010. – Vol. 31. – № 6. – P. 760–769.

174. Yao C. Surface modification and antibacterial activity of electrospun polyurethane fibrous membranes with quaternary ammonium moieties / C. Yao, X. Li, K.G. Neoh, Z. Shi, E.T. Kang // *Journal of membrane science* – 2008. – Vol. 320. – № 1–2. – P. 259–267.

175. Yoon C.S. Keystone-designed perforator island flaps for the coverage of traumatic pretibial defects in patients with comorbidities. / C.S. Yoon, S.I. Kim, H. Kim, K.N. Kim // *International journal lower extremity wounds*. – 2017. – Vol. 16. – P. 302–9.

176. Zamad M. Healing by primary intention versus healing by secondary intention after third molar surgery / M. Zamad, V. Kolte, B. Pramod Krishna // *International journal of current research*. – 2018. – Vol. 10. – № 5. – P. 69886–69888.

177. Zhao N. Dual aptamer-functionalized in situ injectable fibrin hydrogel for promotion of angiogenesis via co-delivery of VEGF and PDGF-BB / N. Zao, A. Suzuki, X. Zhang, P. Shi, L. Abune, J. Coyne, H. Jia, N. Xiong., G. Zhang., Y. Wang // *ACS Applied material and interfaces*. – 2019. – Vol. 10. – P. 44–68.